

SENSOR PLATFORM AND METHOD FOR THE PARALLEL DETECTION OF A PLURALITY OF ANALYTES USING EVANESCENTLY EXCITED LUMINESCENCE

Publication number: JP11505610 (T)

Publication date: 1999-05-21

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: G01N21/64; G01N21/27; G01N21/55; G01N21/76; G01N21/77; G01N21/05; G01N21/64; G01N21/25; G01N21/55; G01N21/76; G01N21/77; G01N21/03; (IPC1-7) G01N21/64; G01N21/77; G01N21/76

- European: G01N21/64P8; G01N21/55B; G01N21/77B

Application number: JP19960533714T 19960502

Priority number(s): CH19950001396 19950512; WO1996EP01817 19960502

Also published as:

WO9635940 (A1)

ZA9603731 (A)

US6078705 (A)

US6269144 (B1)

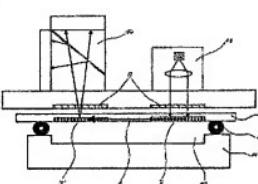
PL323257 (A1)

more >>

Abstract not available for JP 11505610 (T)

Abstract of corresponding document: WO 9635940 (A1)

The invention relates to a sensor platform based on at least two planar, separate, inorganic dielectric waveguiding regions on a common substrate and to a method for the parallel evanescent excitation and detection of the luminescence of identical different analytes. The invention relates also to a modified sensor platform that consists of the sensor platform having the planar, separate, inorganic dielectric waveguiding regions and one or more organic phases immobilized thereon. A further subject of the invention is the use of the sensor platform or of the modified sensor platform in a luminescence detection method for quantitative affinity sensing and for the selective quantitative determination of luminescent constituents of optically opaque solutions.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(10)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-505610

(43)公表日 平成11年(1999)5月21日

(51) Int.Cl.[®]
G 0 1 N 21/64
21/27
21/76

識別記号

F I
G 0 1 N 21/64
21/27
21/76

Z
C

検査請求 未請求 予備審査請求 右 (全 60 頁)

(21) 出願番号 特願平8-533714
 (56) (22)出願日 平成8年(1996)5月2日
 (56)翻訳文提出日 平成9年(1997)11月11日
 (66) 国際出願番号 PCT/EP96/01817
 (67) 国際公開番号 WO96/35540
 (67) 国際公開日 平成8年(1996)11月14日
 (31) 優先権主張番号 1396/95-0
 (32) 優先日 1995年5月12日
 (33) 優先権主張国 スイス(CI)

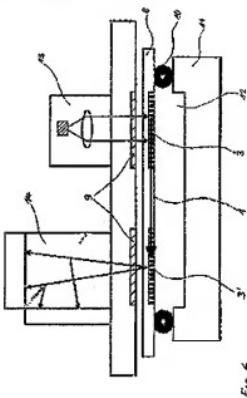
(71) 出願人 ノバルティス・アクチングゼルシャフト
スイス、ツェーハー-4059バーゼル、シュ
バルツバールアレー-215番
 (72) 発明者 ノイシェーファー、ディーター
スイス、ツェーハー-4132ムッテンツ、ル
ツヴァートシュトラーゼ40番
 (72) 発明者 ドゥヴェネック、グレト・ルートヴィッヒ
ドイツ連邦共和国デーベ-70189パート・ク
ロツィンゲン、エツマッテンブエケ34番
 (74) 代理人 弁理士 青山 薫 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 消極的に励起されたルミネセンスを用いた複数の分析対象物質の並列的検出のためのセンサプラットホームおよび方法

(57) 【要約】

本発明は、共通の基板上にある少なくとも2つの平面状、独立、無機質の誘電体導波路岐を基礎としたセンサプラットホームと、同一または異なる分析対象物質のルミネセンスの並列的、消極的励起および検出のための方法とに属する。本発明はまた、平面状、独立、無機質の誘電体導波路岐とそれらの基板上に固定化された1つ以上の有機物を有するセンサプラットホームを包含する変型されたセンサプラットホームに関する。本発明のさらなる対象は、定量的なアフニティセンシングおよび光学的に不透明な溶液における発光成分の選択的検出のためのルミネセンス検出方法における前記センサプラットホームまたは前記変形されたセンサプラットホームの使用である。



【特許請求の範囲】

1. 連続した基板と透過性で平面状、無機質の誘電体導波層とを包含するセンサプラットホームであって、
 - a) 前記透過性で無機質の誘電体導波層が少なくとも測定領域において少なくとも2つの導波領域に分割されており、波が導波される領域の有効屈折率が周囲の領域よりも大きいか、または前記導波層の分割が入射光を吸収するその表面上の物質により行なわれるという事実により分割されており；
 - b) 波動ベクトルの伝播方向が入射後に維持されるように、前記導波領域がそれぞれ1個の入射グレーティングまたは共通の入射グレーティングを備えており；
 - c) 適切な場合、前記導波領域がそれぞれ1個の出射グレーティングまたは共通の出射グレーティングを備えていることを特徴とするセンサプラットホーム。
2. 前記導波領域が独立したストリップ、方形、円、梢円またはチェス盤パターンの形状に配列されていることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。
3. 前記導波領域が平行なストリップの形状に配列されていることを特徴とする請求項2に記載のセンサプラットホーム。
4. 前記導波領域が、一端または両端で接合される平行なストリップの形状に配列されていることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。
5. 複数の導波領域への分割が、前記導波領域とその隣接する材料との間の有効屈折率の変化によって実現され、前記有効屈折率の差が0.2単位よりも大きいことを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。
6. 複数の導波領域への分割が、導波層表面上の吸収性材料によって実現されることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。
7. 複数の導波領域への分割が、導波層表面上のコロイド状に付着した金属によって実現されることを特徴とする請求項6に記載のセンサプラットホーム。
8. 複数の導波領域への分割が、導波層表面上のコロイド状に付着した金によって実現されることを特徴とする請求項7に記載のセンサプラットホーム。
9. 複数の導波領域への分割が、導波層表面上のコロイド状に付着した金属に

(3)

特表平11-505610

よって実現され、前記表面が接着促進剤の層により修飾されていることを特徴とする請求項7に記載のセンサプラットホーム。

10. 前記導波領域のストリップ幅が5マイクロメートルないし5ミリメートルであることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

11. 前記導波領域のストリップ幅が50マイクロメートルないし1ミリメートルであることを特徴とする請求項10に記載のセンサプラットホーム。

12. ストリップ形状を有する前記個々の導波領域の長さが0.5ないし50mmであることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

13. 前記センサプラットホーム上のストリップの数が2ないし1000であること特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

14. 前記基板上の前記個々の導波領域が多重検出領域を形成するように配置されていることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

15. 各多重検出領域が2ないし50の独立した導波領域を包含していることを

特徴とする請求項14に記載のセンサプラットホーム。

16. 前記センサプラットホーム上に2ないし100の多重検出領域を有する請求項14に記載のセンサプラットホーム。

17. 中央切欠き部(6)を中心として自由に回転可能なディスクの形状を有する請求項14に記載のセンサプラットホームであつて、前記ディスクを励起および検出用光学装置の下方で前記切欠き部(6)を中心として回転させると複数の多重検出を連続して実施することができるよう、前記センサプラットホーム上に複数の多重検出領域(4)が接線方向または放射状に配列されていることを特徴とするセンサプラットホーム。

18. 方形またはストリップの形状を有する請求項14に記載のセンサプラットホームであつて、前記センサプラットホームを励起および検出用光学装置の下方で構方向に移動させると複数の多重検出を連続して実施することができるよう前記方形またはストリップ上に多重検出領域(4)が配列されていることを特徴とするセンサプラットホーム。

19. 前記基板がガラス、石英または遮過性の熱可塑性プラスチック材料である

(4)

特許平11-505610

ことを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

20. 前記基板がポリカーボネート、ポリイミド、またはポリメタクリル酸メチルを包含していることを特徴とする請求項19に記載のセンサプラットホーム。

21. 前記屈折率がすべての導波領域に關して同一であることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

22. 前記導波領域の屈折率が2よりも大きいことを特徴とする請求項1に記

載のセンサプラットホーム。

23. 前記導波領域がTiO₂、ZnO、Nb₂O₅、Ta₂O₅、HfO₂またはZrO₂を包含していることを特徴とする請求項22に記載のセンサプラットホーム。

24. 前記導波領域がTiO₂またはTa₂O₅を包含していることを特徴とする請求項23に記載のセンサプラットホーム。

25. 前記導波領域の厚さが40ないし300nmであることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

26. 前記導波領域の厚さが40ないし160nmであることを特徴とする請求項25に記載のセンサプラットホーム。

27. 前記グレーティングの変調深度が3ないし60nmであることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

28. 前記導波層の厚さに対する変調深度の比が0.5以下であることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

29. 前記導波層の厚さに対する変調深度の比が0.2以下であることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

30. 前記グレーティングの周期が200ないし1000nmであることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

31. a) 前記センサプラットホーム上における透過性で平面状、無機質の誘

電体導波領域が、屈折率の少なくとも0.6の増減により測定部に沿って相互に区分されており、

b) 各領域が1個または2個の独立したグレーティングカプラを備えているか、またはすべての領域全体で1個または2個の共通のグレーティングカプラを備えており、

c) 前記透過性で平面状、無機質の誘電体導波領域における厚さが40ないし160 nm、前記グレーティングの変調深度が3ないし60 nm、厚さに対する変調深度の比が0.5以下であることを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

32. 前記導波領域が1つないし3つのモードを導波することを特徴とする請求項1に記載のセンサプラットホーム。

33. 適切に構成されたマスクの下で、真空状態において、無機質の導波材料を蒸着することを包含する請求項1に記載のセンサプラットホームの作製方法。

34. 最初のステップにおいて、連続した層を形成するため無機質の導波材料を蒸着することと、その後、前記の層を機械的なスクラッチング、レーザによる材料加工、リソグラフィ加工またはプラズマ加工によって個々の導波領域に分割することとを包含する請求項1に記載のセンサプラットホームの作型方法。

35. 適切に構成された方式により、コロイド溶液から前記表面上に無機質の吸収性金属を付着させることを包含する請求項1に記載のセンサプラットホームの作製方法。

36. 適切に構成された方式により、コロイド溶液から前記表面上に粒子の大きさが少なくとも10 nmの金を付着させることを包含する請求項1に記載のセンサプラットホームの作型方法。

37. 前記粒子の大きさが15ないし35 nmであることを特徴とする請求項36に記載のセンサプラットホームの作型方法。

38. 請求項1に記載の導波領域の表面上に、1以上の同一または異なる分析対象物質に関する化学的または生化学的認識要素として1以上の特異的結合パートナーが固定化されていることを特徴とする変形されたセンサプラットホーム。

39. 各導波領域の表面上の前記特異的結合パートナーが相互に物理的に分離されていることを特徴とする請求項38に記載の変形されたセンサプラットホーム。

(6)

特表平11-505610

40. 各導波領域の表面に特異的結合パートナーが1種だけ配置されていることを特徴とする請求項38に記載の変形されたセンサプラットホーム。
41. 前記導波領域と前記固定化された特異的結合パートナーとの間に付着促進層が配置されていることを特徴とする請求項38に記載の変形されたセンサプラットホーム。
42. 金のコロイドと共有結合した特異的結合パートナーが前記導波領域上に配置されており、前記金のコロイドが10nmより小さいことを特徴とする請求項38に記載の変形されたセンサプラットホーム。
43. 多重流路貫流セルを通じて、溶解させた前記特異的結合パートナーを前記独立した導波領域にわたって通過させることを包含する請求項38に記載の変形されたセンサプラットホームを作製する方法であって、前記多重流路セルの流路が流体工学的または物理的に分離されていることを特徴とする方法。
44. 溶解させた前記特異的結合パートナーを前記独立した導波領域にスキャンプによって付着させることを包含する請求項38に記載の変形されたセンサプラットホームを作製する方法。
45. 請求項1または請求項38のいずれかに記載のセンサプラットホームまたは変形されたセンサプラットホームを用いて1以上のルミネセンスを並列的に決定する方法であって、1以上の液体試料を前記センサプラットホーム上の1以上の導波領域と接触させることと、励起光を前記導波領域に入射させることと、励起光を前記導波領域内に透過させることと、それにより前記試料中の発光物質または前記導波領域上に固定化された発光物質をエバネッセントフィールド内において並列的に励起することと、それにより発生したルミネセンスをオプトエレクトロニクス装置を用いて測定することとを包含する方法。
46. ルミネセンス励起のために波長が300ないし1100nmのコヒーレント光が使用されることを特徴とする請求項45に記載の1以上のルミネセンスを並列的に決定する方法。
47. ルミネセンス励起のために波長が450ないし850nmのレーザ光が使用されることを特徴とする請求項46に記載の1以上のルミネセンスを並列的に決定する

(7)

特表平11-505610

方法。

48. 機能化された発光染料が、ローダミン；フルオレセイン誘導体；クマリン誘導体；ジスチリルビフェニル；スチルベン誘導体；フタロシアニン；ナフタロシアニン；トリス（2, 2' - ビビリジル）ルテニウム塩化物、トリス（1, 1' - フェナントロリン）ルテニウム塩化物、トリス（4, 7-ジフェニル-1, 10-フェナントロリン）ルテニウム塩化物、ポリビリジル／フェナジン／ルテニウム錯体などのポリビリジル／ルテニウム錯体；白金／ポルフィリン錯体；ユラロピウムおよびテルビウム錯体；およびシアニン色素からなる部類から選択さ

れることを特徴とする請求項45に記載の1以上のルミネセンスを並列的に決定する方法。

49. 前記発光染料としてフルオレセインイソチオシアナートが使用されることを特徴とする請求項48に記載の1以上のルミネセンスを並列的に決定する方法。

50. 消散的に励起され等方的に放射されたルミネセンスが検出されることを特徴とする請求項45に記載の方法。

51. 前記導波層内に再結合された前記消散的に励起されたルミネセンスが出射グレーティングを介して、または前記センサプラットホーム緑部において検出されることを特徴とする請求項45に記載の方法。

52. 等方的に放射されたルミネセンスと、再結合されたルミネセンスとの双方が相互に独立に、しかし同時に検出されることを特徴とする請求項45に記載の方法。

53. 放射された前記励起光の吸収が同時に判定されることを特徴とする請求項45に記載の方法。

54. 同一または異なる波長のさまざまなレーザ光源によって前記ルミネセンスが励起されることを特徴とする請求項45に記載の方法。

55. 一列のダイオードレーザによって前記ルミネセンスが励起されることを特徴とする請求項45に記載の方法。

56. 分析される前記試料が卵黄、血液、血清、血漿または尿であることを特

(8)

特表平11-505610

徵とする請求項45に記載の方法。

57. 分析される前記試料が表面水、土壌または植物の抽出物、または生物学的プロセスまたは合成プロセスによる酒であることを特徵とする請求項45に記載の方法。

58. アフィニティセンシングにおける生物学的物質の定量のための、請求項1または請求項38のいずれかに記載のセンサプラットホームまたは変形されたセンサプラットホームの使用。

59. 抗体または抗原、レセプターまたはリガンド、キレート化剤またはヒストジン標識成分、オリゴヌクレオチド、DNA鎖またはRNA鎖、DNAまたはRNAのアログ、酵素、酵素基質、酵素補因子または酵素阻害剤、レクチンおよび炭水化物の定量のための、請求項1または請求項38のいずれかに記載のセンサプラットホームまたは変形されたセンサプラットホームの使用。

60. 光学的に不透明な流体における発光成分の選択的定量のための、請求項1または請求項38のいずれかに記載のセンサプラットホームまたは変形されたセンサプラットホームの使用。

【発明の詳細な説明】

消散的に励起されたルミネセンスを用いた複数の分析対象物質の並列的検出のためのセンサプラットホームおよび方法

本発明は、共通の基板上にある少なくとも2つの平面状、独立、無機質の誘電体導波領域を基礎としたセンサプラットホームと、同一または異なる分析対象物質のルミネセンスの並列的、消散的な励起および検出のための方法に関する。本発明はまた、平面状、独立、無機質の誘電体導波領域とそれらの領域上に固定化された1つ以上の有機相を有するセンサプラットホームを包含する変型されたセンサプラットホームに関する。本発明のさらなる対象は、定量的なアフィニティセンシングおよび光学的に不透明な溶液における発光成分の選択的定量のためのルミネセンス検出方法における前記センサプラットホームまたは前記変形されたセンサプラットホームの使用である。

屈折率が低い媒質に囲まれた平面状の導波路内に光波が入射すると、その光波は導波層の境界での全反射により制限を受ける。最も単純な例では、平面状の導波路は、基板、導波層、上層（または調査すべき試料）の3層のシステムで構成されており、この導波層の屈折率が最も高い。付加的な中間層により、この平面状導波路の作用をさらに改善することができる。

この構成において、電磁エネルギーの一部は屈折率が低い媒質内に入る。この部分はエバネッセント（減衰）フィールドと呼ばれる。エバネッセントフィールドの強さは、導波層自体の厚さおよび、導波層とそれを囲む媒質との屈折率の比に非常に大きく依存している。薄い導波層の場合、すなわち層の厚さが、導波される波長と同じかそれよりも小さい場合、導波光の離散的モードを弁別することができる。

エバネッセントフィールドを用いると、例えば、屈折率が相対的に低い媒質内のルミネセンスを励起し、導波領域の直近のみでそのルミネセンスを励起することが可能である。この原理はエバネッセントルミネセンス励起として知られている。

エバネッセントルミネセンス励起は、励起が導波層直近に限定されているので

、分析の分野で大きな関心を集めている。発光染料で標識された抗体または抗原の消散的に励起されたルミネセンスを決定する方法および装置は、既知のものであり、例えば、U.S.-A-4 582 809に記述されている。そこで特許請求された装置は、エバネッセントルミネセンス励起のため光ファイバを用いている。そのような光ファイバは、直径が通常1ミリメートルまであり、レーザ光が入射すると多くのモードを導波する。消散的に励起されたルミネセンスは、それらのファイバ内に再入射した部分によってのみ容易に測定することが可能である。さらに不利な点は、その装置が相対的に大きく、比較的多量の試料が必要となるということである。この装置の大きさをさらに実質的に減らす余地はほとんどなく、一体型光センサ製造のための小型化に関してはなおさらである。

感度の増大は、一般的に装置の大きさの増大と関連している。

平面状の光導波路を使用し、エバネッセント励起状態においてバイオセンサのルミネセンスを測定するための測光機器も同様に既知であり、例えばWO90/06503に記述されている。この明細書で用いられる導波層は厚さが160 nmないし1000 nmであり、励起波はグレーティングカプラを用いることなしに入射する。

消散的に励起されたルミネセンスの感度を増大させるため、また一体型光センサ作製のため、さまざまな試みが行なわれている。例えば、バイオセンサーズ・アンド・バイオエレクトロニクス (Biosensors & Bioelectronics) 第6巻 (1991年) 595-607頁には、二段階イオン交換法で作製され、プリズムを用いて励起波を入射させる平面状の單一モードまたは低モードの導波路が記述されている。使用される親和力系はヒト免疫グロブリンG／フルオレセイン標識されたプロテインAであり、抗体は導波路上に固定化され、検出されるべきフルオレセイン標識されたプロテインAはリン酸塩緩衝液とともに、導波路の測定領域を覆うポリビニアルコールの膜に加えられる。

この方法における考慮すべき不利な点は、導波層と基板層との屈折率の違いが

小さなものにしかならず、その結果、感度が相対的に低くなるということである。

その感度は、フルオレセイン標識されたプロテインA 20 nMである。極微量の

(11)

特許平11-505610

判定にはそれでも不十分なので、さらに感度を増大させる必要がある。また、プリズムを用いる光の入射は再現および実施が困難であり、その大きな理由は、入射効率がプリズムと導波路との接触面の状態および大きさに依存していることによる。

U.S.-A-5 081 012には、別の原理が提案されている。平面状の導波層は厚さが200 nmないし1000 nmであり、2個のグレーティングを包含していて、その一方は反射グレーティングの形状を備えている。その結果、入射した光波はそれらグレーティングの間のセンサ領域を少なくとも2回通過しなければならず、それにより感度が増大することになる。不利な点は、反射された放射が背景放射強度の望ましくない増大をもたらしうるということである。

WO91/10122には、入射グレーティングと物理的に遠隔した出射グレーティングとを包含する薄層分光センサについて記述がなされている。屈折率の高い無機金属酸化物を導波層として用いると、特に吸収測定に適している。多色光源の入射および出射に適したさまざまな実施例が説明されている。導波層の好適な厚さは200 nm超であり、グレーティングの深さはおよそ100 nmとすべきである。これらの条件では、低い感度しか得られないのでアフィニティセンシングにおけるルミネセンスの測定には適していない。このことは、アプライド・オプティクス (Appl. Optics) 第29巻第31号 (1990年) 4583-4589頁において、これらのシステムの全体的効率が633 nmで0.3%、514 nmで0.01%であるというデータにより確認される。

同じセンサの別の実施例では、ガス混合体分析計として使用可能な複数の平面状重合体導波層が基板に付加される。この場合、有効屈折率の変化または、例えば溶媒蒸気と接触する重合体導波路の厚さの変化が利用される。導波路の構造はそれによって物理的に変化する。しかし、そのような変化は、入射の変化や散乱の増大を招き、感度を大きく低下させる可能性があるのでアフィニティセンシングにおけるルミネセンスの測定にとってはまったく不適当である。

平面状導波路の作製工程では、基板の平面性、導波層の一定の厚みおよび均質性、使用される材料の屈折率がきわめて重要である。このことは例えば、E.P.-

(12)

特許平11-505610

A-0 533 074に記述されており、この明細書では、プラスチック基板への無機質の導波層の付加が提案されている。これには例えば、グレーティングカプラの構成が、この構成をプラスチック内に圧入することにより経済的に実施できるという利点がある。しかし一方では、プラスチック基板の光学的性質に関する必要条件も高まることになる。

平面状導波路には、ファイバオプティクスを基礎とした導波路に対し、工業的生産に関して相当な利点がある。特に、ファイバの場合には、完璧な光学的性質を実現するため切断端部を研磨することが一般に必要となる。一方、平面状導波路は、シート形状で作製し、その後所望の寸法に打ち抜くか破断または切断することが可能である。端部の仕上げは多くの場合不要であり、より経済的な大量生産が可能となる。

グレーティングカプラを備えた平面状導波路のさらなる利点は、測定装置の調整が簡易であり、また例えば分析対象物質を固定化するためのコーティングが簡易に実施できるということである。そのために、再現可能な一定の層厚をつくり出すことのできる標準的なコーティング技法を用いることができる。そのような方法の例としては、噴霧、ナイフによる塗布、回転塗布および浸漬がある。品質管理も、既知の非常に精密な方法を用いた簡易な方式で実施することができる。例えば、適切な顯微鏡的または干渉計的な方法、偏光解析法または接触角測定がある。これらの方法は、ファイバオプティクスに基づいた導波路に見られるような弯曲した表面には利用できないか、または利用できても困難を伴う。

導波層それ自体とともに、導波層への光波の入射の性質も大きな問題をもたらす。一体型光センサの先細の導波路に光を入射させるためのグレーティングに関する要件は、例えば「ケミカル・バイオケミカル・アンド・エンヴィアイロンメンタル・ファイバセンサーズ (Chemical, Biochemical and Environmental Fiber Sensors) V」、Proc. SPIE 第2068巻、313-325頁 (1994年) に示されている。

グレーティングの変調深度および導波層の厚さは決定的に重要な特

徴として記述されている。この刊行物に提案されているシステムは、検出されるルミネセンスへの言及は行なわれていないが、例えば一体型光度計として使用す

ることができる。

一体型グレーティングカプラを備えたそのような平面状導波路をルミネセンス測定のため使用する場合、それらの有用性および高感度の実現にとって不可欠な特徴は、適切な入射効率、できるだけ強力なエバネッセントフィールド、および被闇場波の低減率である。これらの特徴は、導波層、基板、および中間層の屈折率の組合せと、導波路の厚さと、グレーティングカプラの構造、変調深度およびグレーティング周期とによって主に決定される。その他の要因には、表面の必要な光学的性質および表面の平面度ないしは粗さがある。

従来技術として説明された消散的に励起されたルミネセンスの検出方法すべてに関する不都合は、均質な膜状のセンサプラットホームでは一度に1つずつの試料しか分析できないということである。同じセンサプラットホームでさらに測定を行なうためには、面倒な洗浄および清掃の作業が必要となる。これは特に、最初に測定された分析対象物質とは異なる分析対象物質で検出を行なう場合に当てはまる。これは一般にイムノアッセイの場合、センサプラットホーム上の固定化層全体を取り替えるか、新しいセンサプラットホームを使用しなければならないことを意味する。

このため、複数の試料を並列的に分析できる方法、すなわち同時に、または附加的な清掃作業なしに次々に分析できる方法を開発する必要がある。

WO95/03538には、例えば、連続した導波層の上に、導波層最上部の試料ブレート内で井戸状をなす複数の試料セルを配置することが提案されている。各試料セルの下には、導波層を通して導波された光の一部を出射するグレーティングが位置している。分析対象物質の検出は、分析対象物質の濃度の関数としての出射角度の変化に基づいて行なわれる。屈折率の変化に基づく方法は一般的に、ルミネセンス法よりも明らかに感度が低い。

WO94/27137には、例えば、消散的に励起された蛍光を用いてイムノアッセイを実施するための装置および方法が提案されている。この装置は、2つの平行

平面状表面と、入射電子としてのレンズとともに作用する側線部とを有する連続した光導波路で構成されている。複数の特異的結合パートナーが少なくとも一方

の表面に固定化されている。好適な実施例では、それらの特異的結合パートナーは相互に物理的に離開するように、連続した導波路上に配列されている。使用例では、それらは導波路表面を覆う点状に配置されている。

開示された実施例に基づけば、この側縁部を通る入射によって達成される効率は、グレーティングを通した入射の場合よりも低くなると仮定しなければならない。さらに、層が厚いことにより（自己支持型導波路）、エバネッセントフィールドの強さ、したがって励起効率は、相対的に層が薄い单一モード導波路の場合よりも相当程度低くなる。全体として、この装置の感度は結果的に限定されたものとなる。

さまざまな特異的結合パートナーが、連続した導波層に配置されるそれらの装置には、蛍光光が蛍光体標識された分子をすべて励起するという不利益がある。したがって位置による測定場所の選択は不可能である。また、消散的に再結合された蛍光フォトンは、隣接した点からの信号に寄与して測定誤差をもたらす。

通信分野に応用される集積光学では、チャネル状の導波路を包含するガラスを主体とした平面状の光学コンポーネントが知られており、それらの導波路チャネルはその表面においてマスクを使用して個々のイオンを交換することにより作製される（グラステクニッセ・ベリヒテ (Glastechnische Berichte) 第62巻285頁（1989年））。それにより、イオンでドープされたチャネルにおいて屈折率のわずかな増加を示す、物理的に相互連結された層がもたらされる。この増加は、一般には5%未満である。このようなコンポーネントは複雑で、作製費用も高くなる。

SPIE第1587巻、「ケミカル・バイオケミカル・アンド・エンヴァイロンメントル・ファイバセンサーズ (Chemical, Biochemical and Environmental Fiber Sensors) III」（1991年）98-113頁において、R. E. クンツ (Kunz) は、分岐してその後再び合流する光導波路であって、干渉計等の集積光学機器に特に適した光導波路について記述している。そのような構造は、消散

的に励起されたルミネセンスの測定には適していない。その理由は、それらの要素を個々に取り扱うことが不可能であり、また複数の分歧点が前後する構成では

、その第1の分歧点において入射した光波の強度が急激に大きな損失を被るためである。そのような分歧の開き角は小さい（通常3°）ので、小型コンポーネントの場合に分歧における2つの枝の間の距離が小さくなるか、さもなければコンポーネントの寸法をそれに応じて大きくする必要があり、そのようなことは一般に望ましいものではない。また、分歧した波の間の固定した位相関係は、ルミネセンスの測定では必要とされないものである。

WO92/19976において、R. クンツは、複合した信号の検出（特にアーティファシャルノーズによる臭気の検出）のための複数の一体型測定ストリップを包含する装置について記述している。

ルミネセンス検出方法のための実質的に単一モードの平面状無機質導波路の使用は、従来技術において包括的に述べられただけであり、ルミネセンスの励起および検出に関する具体的な要件の説明は行なわれていない。特に、良好ないし非常に良好な結果を得ることのできる層の厚さの範囲または変調深度は示されていない。

共通の基板上にある少なくとも2つの平面状、独立、無機質の誘電体導波領域をベースにしたセンサプラットホームを、簡易な方法で作製できることが知られている。このプラットホームは、同一または異なる分析対象物質におけるルミネセンスの並列的消散的な励起および検出に適している。それらの独立した導波領域はそれぞれ1個以上の結合グレーティングを備えている。

このセンサプラットホームの大きな利点は、例えばいくつかの試料溶液を高感度で同時に検出できるということである。各測定の間の洗浄または清掃処理は必要なく、その結果、単位時間当たりの試料処理量が高くなる。これは特に日常的分析または遺伝子工学分野の分析に関して非常に重要なことである。

複数の試料溶液の同時分析に加え、1つの試料溶液をその分析対象物質のいくつかに関して1つのセンサプラットホーム上で同時に、または連続して試験することもできる。これは、特に迅速かつ経済的に実施することができる血液または

血清の試験の場合に特に有利である。

いくつかの試料溶液を同時に分析する場合、導波領域が独立していることによ

(16)

特表平11-505610

り、異なる試料からのルミネセンス信号間におけるクロストークが防止される。この方法により、高い選択性と低い誤り率が実現される。

また導波領域が独立しているため、波長の異なる光源を目標に向かって使用することにより、選択性および感度をさらに高めることができる。

前記センサプラットホームのさらなる利点は、個々の独立した導波領域を光学的、化学的または流体工学的に選択して使用できるということである。

ただ1つまたは少数のモードが導波される物理的または光学的に独立した平面状導波領域を備えたセンサプラットホームが特に適している。そのようなセンサプラットホームは、特に高い感度と非常に小型の構成によって特徴づけられる。一般に、この程度の感度は平面状に構成された多モード導波路では実現されない。

励起光は例えばレンズ、プリズムまたはグレーティングを用いて入射させるか、または導波層の端面に直接入射させることができる。

グレーティングを用いた入射および、適切な場合の出射は、レンズまたはプリズムを用いる場合よりも一般に簡易であり、より効率的である。その結果、入射した光波の強度も、より大きくなる。これは、導波された光波の減衰率が低いことと併せて、この構成における感度の非常に高さをもたらすものである。

できる限り強力なエバネッセントフィールドを用いることにより、感度をさらに高めることができる。これにより、導波層表面の非常に少量の発光物質についても測定を行なうことが可能となる。

本発明の対象は、連続した透過性の基板と透過性で平面状、無機質の誘電体導波層とを包含するセンサプラットホームであって、

a) 前記透過性で平面状、無機質の誘電体導波層が少なくとも測定領域において少なくとも2つの導波領域に分割されており、波が導波される領域の有効屈折率がその周囲の領域よりも大きいか、または導波層の分割が入射光を吸収するその表面上の物質により行なわれるという事実により分割されており；

b) 波動ベクトルの伝搬方向が入射後に維持されるように、前記導波領域がそれ

ぞれ1個の入射グレーティングまたは共通の入射グレーティングを備えており；

c) 適切な場合、前記導波領域がそれぞれ1個の出射グレーティングまたは共通の出射グレーティングを備えていることを特徴とするセンサプラットホームである。

本発明は、例えば両端において初めにY字状に分岐した後合流する2つの導波領域による構成を包含していない。その理由は、その場合波動ベクトルの伝搬方向が入射後に変化するためである。このような構成は、既知のものであり、例えば干渉計として用いられている。

本発明において、独立した導波領域の目的は、1以上の分析対象物質からの消散的に励起されたルミネセンスを同時検出するためのセンサプラットホームを提供することにある。

「測定部」および「測定領域」という語句は、本発明の文脈においては同義のものとして用いられる。

独立した導波領域の外形自体は任意に選択できるものである。この外形は、センサプラットホームが取り付けられる全体的な装置の構成に基づき決定すると有利である。この外形の例は、直線、ストリップ、方形、円、橢円、チェス盤パターン、菱形、ハニカムパターンまたは不規則なモザイクである。個々の導波領域間の分割部は本質的に直線である。これらの分割部は例えば両端に達していてもよく、全体的に測定領域より広くても狭くてもよい。

前記導波領域は好ましくはストリップ、方形、円、橢円およびチェス盤パターンの形状に配列される。

前記導波領域は特に平行なストリップ形状に配列される。

さらに好適な実施例は、前記導波領域を、一端または両端で接合される平行なストリップ形状に配列し、波動ベクトルの伝搬方向を入射後も不変に維持することにより得られる。

別の有利な実施例は、前記ストリップが一端では合流して他端では開いており、波動ベクトルの伝搬方向が入射後も不変のままであるようなものである。

図1aから1dおよび2aから2dは、より実現可能性の高い構成のいくつ

かを示したものである。

それぞれの参照符号は以下のものを示している：

- 1 基板に付加された導波層；
- 2 導波層表面の吸収性材料によって、または層の平面における有効屈折率の低減（最も簡単な方法としては導波層の代わりに空隙を設けるもの）によって形成される領域；
- 3、3' それぞれ入射および出射グレーティング。

図1aでは、導波領域（測定領域）が仕切領域によって中断されている。それらの仕切領域は結合要素とは接触しない。

図1bの場合、すべての測定領域に共通の入射グレーティングおよび出射グレーティングが存在している。仕切領域との接触はない。

図1cでは、仕切領域が結合要素を越えて延びている。しかし、そのことにより導波領域における入射は影響されない。

図1dは、2つの結合グレーティングを包含しているが、その他の点は図1cと一致している。

図2aから2dは、結合グレーティングが連続しておらず、各導波領域が個別にグレーティングを有している構成を示している。

物理的または光学的に独立した導波領域は、既知の方法により作製することができる。2つの基本的な方法が実施可能である。例えば、a) マスクを用いた蒸着法により最初から物理的に分離して層を形成するか、またはb) 連続した層を作製した後に適切な方法を用いて構成する。

方法a)の例としては、センサプラットホームの一部を覆う適切に構成されたマスクを用いた、無機質の導波材料の蒸着がある。そのようなマスクは、集積回路の製造において既知のものである。これらのマスクはセンサプラットホームと直接接觸させる必要がある。ポジまたはネガのマスクを使用することができる。

無機質の導波材料の懸濁液を適切に構成されたマスクを通してセンサプラットホームに塗布し、ゾルゲル技術によって導波層を形成することも可能である。

この方法により、独立した導波領域が形成され、その分割は最も簡単な例で

は空隙によって行なわれる。この空隙はその後、導波層よりも屈折率の低い別の

(19)

特許平11-505610

材料で満たすことができる。いくつかの導波領域への分割がこの方法で行なわれる場合、導波領域と隣接する材料との間の有効屈折率の差は好ましくは0.2単位を超える、特に好ましくは0.6単位を超える。

方法⑥の例としては、無機質の導波材料の蒸着により連続した層を形成し、その後この層を機械的なスクラッピング、レーザによる材料加工、リソグラフィ加工またはプラズマ加工によって個々の導波領域に分割するものがある。

この蒸着は一般に真空状態で実施される。プラズマ蒸着も同様に可能である。

バルス化エキシマレーザおよび固体レーザまたは連続的ガスレーザを用いた加工について特別に言及する必要がある。バルス化高エネルギー レーザの場合、この構成を、マスクを介して広範囲に実施することができる。連続的に動作するレーザの場合、集束されたビームが、構成される導波層を全般的に通過するか、または導波層がビームに対して移動する。

適切なリソグラフィ加工方法は、プリント回路基板または超小型電子部品の製造に用いられるようなエッチング技術である。これらの方法により、非常に多様な幾何学的パターンおよびマイクロメートルの範囲またはマイクロメートル未満の範囲での構成の精密さが実現可能となる。

削磨的な加工方法の場合、導波層は部分的には完全に除去されるが、センサプラットホームは完全には分割されないことが重要である。中間層が存在する場合、同様に完全にまたは部分的に除去することができる。

方法⑥の変形においては、無機質の導波材料の連続した層が最初に付加され、その後第2の段階において、導波路を中断する吸収性材料を用いて、導波領域が吸収領域、すなわち非導波領域によって分割されるような方式でその層に構成が行なわれる。

この吸収性材料は、金、銀、クロム、ニッケルなどの光吸収係数の高い金属のような無機材料や、例えば染色、着色された重合体などの有機化合物とすることができる。これらの材料は、連続した層、または金属の場合のようにコロイド水溶液の形で導波層に付加することができる。別の方法の選択も可能である。

真空状態で実施される構成のための蒸着方法はすでに上記において言及されて

いる。

水中の金などの、水または有機溶媒中のコロイド状物質も同様に導波領域構成のため使用することができる。

自然発生的な「集合」による、表面へのコロイド状の金の付着は、例えばR. グリフィスら (R. Griffith et al.) (「サイエンス (Science)」第267巻 1629-1632頁 (1995年)) により記述されている。例えば、金のコロイド溶液の物理的または流体工学的に分離した層分離を導波層上に流动させ、金の粒子を例えばストリップの形状に付着させてもよい。表面を乾燥させると、本発明による独立した導波領域が得られる。塗ましい吸収が行なわれるためには、付着した金のコロイドは、最小で10ないし15nmの大きさを有していなければならぬ。このコロイドの直径は好ましくは15ないし35nmである。

コロイド状の金の付着は、表面へのスタンピングによっても実施することができる。溶解した有機材料のスタンピングは、ホワイトサイズ (Whitesides) により「マイクロコンタクト・プリントイング (microcontact printing)」として記述されており、液体アルカンチオールを使用して金の表面を構成するために用いられている (J. L. ウィルバーら (J. L. Wilbur et al.), Adv. Mater., 第6巻 600-604頁 (1994年) ; Y. シア (Xia) および G. M. ホワイトサイズ, J. Am. Chem. Soc., 第117巻 3274-3275頁 (1995年))。例えば、金のコロイド溶液を、所望の構成パターンを有するエラストマー型のスタンプ内に吸引し、このスタンプを当接させることによりその構成パターンを導波表面に転写することができる。

有機溶媒または水を使用する方法は使用に際して融通性が非常に高く容易に使用できる。これらの方法により、ルミネセンスアッセイの実施直前に導波路の構成を行なうことができる。

場合によっては、例えば金のコロイド付着の前に、コロイド粒子と導波層表面とが良好に付着するように導波層表面を修飾する必要がある。この付着は、疎水相互作用、ファンデルワールスカ、双極子-双極子相互作用、単純な静電相互

作用または共有結合によって実現される。この相互作用は、コロイドおよび／も

たは導波層表面の機能化によってもたらされる。

表面の修飾および付着の実現の適切な方法は、例えば「アドヴァンシス・イン・コロイド・アンド・インターフェース・サイエンス (Advances in Colloid and Interface Science)」第6巻、L. ボクサニ (Boksanyi)、O. リアドン (Lia rdon) およびE. コヴァツ (Kovacs)、95-137頁 (1976年) に記述されているようなシラン化である。このようなシラン化は、アフィニティセンシングにおける認識要素の付着を改善するためにも用いられる。特に(メルカブトメチル)ジメチルエトキシンシランなどのメルカブト末端シランは、確實-金共有結合の形成により金の付着をもたらすのに適している。

方法b)の別の変形は、第2段階において、無機質導波材料の連続した層に同じ無機材料をある構成の形に付着させることにあり、その結果、層の厚さを増すことにより、有効屈折率の増大がもたらされ、それにより光波モードの伝搬が結果的に測定領域に集中する。このような「スラブ導波路」およびその作製法は、「半導体集積光学概論 (Introduction to Semiconductor Integrated Optics)」(アーテックハウス社 (Artech House Inc.) (1995年))においてH. P. ザッペ (Zappe) により記述されている。

これら導波層のストリップ幅は、好ましくは5マイクロメートルないし5ミリメートルであり、特に好ましくは50マイクロメートルないし1ミリメートルである。

導波領域の幅が狭くなりすぎると、利用可能なセンサ領域も小さくなる。ストリップ幅と必要なセンサ領域とは相互に適合していると有利である。

個々の導波領域の大きさおよび幅は、広範囲に変化させることができ、それらは意図された用途および全体的なシステムの構成に実質的に依存している。

導波領域がストリップ形状の場合、個々の導波領域の長さは好ましくは0.5ないし50mmであり、特に好ましくは1ないし20mmであり、さらに好ましくは2ないし10mmである。

センサプラットホーム上のストリップの数は、好ましくは2ないし1000であ

り、特に好ましくは2ないし100である。

個々の導波領域は、例えば基板上のストリップとして、各組少なくとも2つのストリップからなる2組以上に分けて配置し、多重検出領域を形成することができる。

このように組み立てられた多重検出領域の大きな実際的利点は、多数の分析対象物質の連続した測定の間にセンサプラットホームの清掃または取り替えを行なう必要がなく、センサプラットホームを励起装置、フルイディクス装置および検出装置に対して変位させればよいということである。

さらなる利点は、このような多重検出領域は、より経済的に作製できるということである。非常に大きな利点は、分割されたセンサプラットホームへの非常に時間がかかり、かつ費用が集中する分離が不要であるということである。

各多重検出領域は、好ましくは2ないし50、特に好ましくは2ないし20の独立した導波領域で構成される。

センサプラットホーム上には好ましくは2ないし100、特に好ましくは5ないし50の多重検出領域が存在する。

図3aおよび3bには、複数の多重検出領域を備えたセンサプラットホームの実施可能な構成が示されており、基板がディスク形状を備えていて、現在コンパクトディスクに使用されているとの同様の方法でプレス成形により作製することが可能である。全体的構成は、複数の多重検出領域を備えたディスク状センサプラットホームと、流体供給路と実際のセル空間とを包含するフルイディクスディスクと、で構成することができる。2つの部品を例えば接着により接合させてユニットを形成する。

しかし、井戸形状のセル空間を代替的にディスク状センサプラットホーム内に形成することもできる。このような実施例はその後平面状の蓋で覆われる。

参照符号1から3までは、上記で定義した通りであり、4はある多重検出領域の全体を示しており、5は基板である。6は、個々の多重検出領域4を回転により励起および検出用光学装置の下方に通過させるために軸を収容することができる中央切欠き部である。7および7'は、アッセイ中に必要となる溶液のため

の入口および出口開口部を示しており、それらの溶液は一般に、少なくとも2つ

の開口部をもつ貢流セルを介して、導波領域上に固定化された認識要素と接触させられる。

多重検出領域は代替的に同心円状に配列してもよい。個々の多重検出領域の間の距離は例えば、5ないし20度の角度で回転させると次の多重検出領域が励起および検出用光学装置の下方に位置するようなものとすることができる。

図4aおよびbには、ディスク上のセンサプラットホームの類似の構造を示しており、図3と比較すると、個々の多重検出領域4が接線方向ではなく放射状に配列されているという違いがあり、それにより表面領域の利用が改善される。

図5aおよび5bには、さらに別の構成が示されている。個々の多重検出領域4は方形のチェス盤パターン状に配列されている。しかし多重検出領域はフィルムストリップ内の個々の画像のように配列することもできる。

このフィルムストリップは平面状要素とするか、または丸く巻かれていてもよい。

個々の多重検出領域は、フィルムと類似の方法で励起および検出用光学装置の下方に移送することが可能である。

前記独立した導波領域に関して示された好適な構成は、多重検出領域の場合にも適用される。

本発明を背景としたセンサプラットホームは、ストリップ、ブレート、円盤その他所望の幾何学的形状に構成可能な自己支持型の要素である。このセンサプラットホームは本質的に平面状である。選択された幾何学的形状はそれ自体、決定的に重要ではなく、センサプラットホームが取り付けられる装置全体の構造に適合するように選択することができる。しかしセンサプラットホームは、励起光源および光電子光学検出システムとは物理的に独立した独立要素として使用することもできる。実質的な小型化を可能とするような構成が好ましい。

適切な基板は例えばすべての種類のガラスまたは石英である。好ましくは、可能な限り光学的屈折率が低く、かつ可能な限り固有のルミネセンスの程度が小さく、またエッティング、研削、研磨などの光学的加工が可能な限り簡易なガラス

が用いられる。この基板は好ましくは、少なくとも励起および放射の波長に同じ

て透過性をもつ。基板の微視的な粗さは可能な限り小さくすべきである。

例えばEP-A-0 533 074に記述されているような透過性の熱可塑性プラスチックを基板として使用することもできる。

さらに、屈折率が基板の屈折率以下であり、かつ厚さが0.01mm以下の薄い層で基板を覗うこともできる。この層は不都合な基板内での蛍光励起を防止し、また基板の表面粗さを低下させるために使用されるものであり、熱可塑性プラスチックか、熱により架橋可能であるかまたは構造的に架橋されたプラスチックか、またはSiO₂などの無機材料で構成することができる。

導波層よりも屈折率が低く、エバネッセントフィールドの侵入深さよりも厚さが相当程度大きい（すなわち100nmよりもはるかに大きい）中間層が存在する場合、励起光がセンサプラットホームの上面から発せられるならば、励起および放射の波長に関するこの中間層のみの透過性で十分である。この場合、基板を吸収性のものにすることができる。

透過性の熱可塑性プラスチックで構成される特に好ましい基板材料はポリカーボネート、ポリイミド、またはポリメタクリル酸メチルである。

すべての導波層に関して屈折率は同一であることが好ましい。すなわち、すべての導波層は好ましくは同じ材料で形成される。

導波層の屈折率は、基板の屈折率および使用される中間層の屈折率よりも大きくなければならない。平面状で透過性の導波層は、好ましくは屈折率が2よりも大きい材料で構成される。

例えば適切な無機材料、特に無機金属酸化物としては、TiO₂、ZnO、Nb₂O₅、Ta₂O₅、HfO₂、ZrO₂などがある。

Ta₂O₅およびTiO₂が好適である。

導波層の厚さは、好ましくは40ないし100nmであり、特に好ましくは40ないし300nmであり、さらに好ましくは40ないし160nmである。

ある好適な実施例では、導波層の厚さは同一である。

グレーティングの変調深度は、好ましくは3ないし60nmであり、特に好ま

しくは3ないし30nmである。

層の厚さに対する変調深度の比は、好ましくは0.5以下であり、特に好ましくは0.2以下である。

励起光の入射のためのグレーティングまたは再結合されたルミネセンス光の出射のためのグレーティングは、光回折格子、好ましくはレリーフグレーティングの形状を備えている。このレリーフ構造はさまざまな形状を取ることができる。適切なものとしては、シヌソイド、方形、のこぎり波などの構成がある。このようなグレーティングの作製法は既知のものである。それらの作製に関しては、フォトリソグラフィまたはホログラフィによる方法およびエッチャング技術が用いられることが多く、それらは例えば「ケミカル・バイオケミカル・アンド・エンジニアリングメンタル・ファイバセンサーズV」、Proc. SPIE、第2068巻、313-325頁（1994年）に記述されている。有機物の基板に関しては、成型またはスタンピングによる方法も利用可能である。

前記グレーティングの構造を基板上に形成した後、導波層に転写して、そこでそのグレーティング構造が自身を複製するようにするか、または導波層自体の中にグレーティングを形成する。

前記グレーティングの周期は、200ないし1000nmとすることができます、グレーティングがただ1つの周期数をもつと、すなわち單一回折性であると有利である。選択されるグレーティング周期は、励起光が一次回折において結合されるようなものであることが好ましい。

前記グレーティングの変調深度は同じ大きさであることが好ましい。

前記グレーティングのバー対スペース比は好ましくは0.5ないし2である。「バー対スペース比」とは、例えば方形グレーティングの場合において、空間の幅に対するバーの幅の比であると理解されるべきである。

前記グレーティングは、励起光を個々の導波層に入射させるためにも、また導波層に再結合されたルミネセンス光を出射させるためにも用いることができる。

ルミネセンスが異なる試料の分析については、入射グレーティングおよび出射グレーティングのすべてまたは一部の格子定数が異なっていると有利なことが

ある。

(26)

特許平11-505610

ある好適な実施例では、格子定数はすべてのグレーティングについて同一である。

グレーティングの一部が光の入射のために使用され、別の一部が光の出射のために使用される場合、入射グレーティングの格子定数は出射グレーティングの格子定数とは異なることが好ましい。

前記グレーティングの間隔は好ましくは $B \leq 3 \cdot X_{1/e}$ であり、 $X_{1/e}$ は、導波された放射の強度 I_0 が I_0/e に低下した距離である。

前記センサプラットホームの好適な実施例の部類においては：

センサプラットホーム上における透過性で平面状、無機質の誘電体導波領域は、少なくとも測定部に沿って、屈折率の少なくとも0.6の増減によって相互に区分されており、各領域が1個または2個の独立したグレーティングカプラを備えているか、またはすべての領域全体で1個または2個の共通のグレーティングカプラを備えており、前記透過性で平面状、無機質の誘電体導波領域は厚さが40ないし160nm、グレーティングの変調深度が3ないし60nm、厚さに対する変調深度の比が0.5以下である。

屈折率の0.6以上の増減をもたらす最も簡易な方法は、導波層を完全に分割して空隙を包含させるか、または測定中選択的に水を包含させることである。

前記導波層は、好ましくは1つないし3つのモードのみを導波し、特に好ましくはそれらは単一モード導波路である。

本発明のさらなる対象は、導波領域の表面上に、1以上の同一または異なる分析対象物質に関する化学的または生化学的認識要素としての1以上の特異的結合パートナーが固定化されていることを特徴とする変形されたセンサプラットホームである。

導波領域の表面にはさまざまな特異的結合パートナーを付加することができ、各導波領域内でのそれらの物理的分離は重要ではない。それらは例えばランダムな混合物として存在していてもよい。そうすれば、放射波長が異なる分析対象物質が出射グレーティングを介して同時に測定される際に有利である。

特異的結合パートナーは、例えばWO94/27137に記述されているような光化学

的架構により、導波領域上のさまざまな場所に固定化することが可能である。もう1つの方法は、固定化される特異的結合パートナーをマルチブルビベットのヘッド部により滴下して加えるものである。この方法は、圧電アクチュエータを備えた変形されたインクジェット印字ヘッドを用いて実施することもできる。この方法は、迅速に実施でき、また非常に少量の使用で済むという利点を有する。これは細いストリップまたはその他の精密に構成された幾何学的パターンの形成に関する前提条件である。

特異的結合パートナーを導波領域上に物理的に分離して固定化するための、実施が非常に容易なもう1つの好適な方法は、フローセルの使用を基礎にしており、この分離を分割バーの形で機械的に、または層流の場合は流体工学的に、フローセル内で実施することができる。この方法において、結合パートナーを供給する分離の幾何学的配置は、センサプラットホーム上の導波領域の配置と実質的に一致している。フローセルを用いたこの固定化方法は、例えば脂質-膜境界レセプターの場合のように、流体媒質内においてのみ安定的な環境に特異的結合パートナーを埋め込む際に特に有利である。

特にこの方法では、上記に記述された非導波領域の形成と同じ方法で、金のコロイドと共有結合した特異的結合パートナーを付着させることができる。固定化領域において導波を行なうためには、10 nm未満、特に5 nm未満の非常に小さな径をもつ金のコロイドを使用する必要がある。

同様に実施の容易なもう1つの方法は、上記非導波領域の形成と類似の方法での、特異的結合パートナーまたは金属と結合した特異的結合パートナーによる表面へのスタンピングを基礎としている。

好適な金属は金である。

好適な物理的に独立したパターンは、ストリップ、方形、円、橢円またはチェス盤のパターンである。

各導波領域の表面に特異的結合パートナーが1種だけ配置されることを特徴

とする変形されたセンサプラットホームが好ましい。

変形されたセンサプラットホームのもう1つの好適な実施例は、付着促進層が

導波領域と固定化された特異的結合パートナーとの間に位置している場合に得られる。

この付着促進層の厚さは好ましくは50nm以下、特に好ましくは20nm未満である。

さらに、光化学的活性化によるか、またはマルチブルビエットヘッド、インクジェットプリンタ、流れの機械的または流動工学的分離を伴うフローセル、コロイド付着、表面のスタンピングなどの湿式化学的方法を用いて、付着促進層を導波領域のみに選択的に加えるか、または非導波領域において不動態化することが可能である。これらの方法は、任意に化学的に修飾または機能化された表面への特異的認識要素の直接的固定化に関して上記にすでに記述されている。

直接的な、または付着促進層による特異的認識要素の導波領域のみへの選択的固定化により、導波領域および非導波領域双方を覆う試料セルを使用する際、信号発生には用いられない領域における分析対象物質の非特異的結合が減少するので、検出方法の感度が増大する。

センサプラットホームに関する上記の好適な構成は、前記変形されたセンサプラットホームにも同様に適用される。

前記変形されたセンサプラットホームは好ましくは完全にまたは部分的に再生可能であり、数回にわたる使用が可能である。適切な条件、例えば低pH、高温、有機溶媒の使用、いわゆるカオトロピック試薬（塩）の使用、の下では、固定化された認識要素の結合能力を実質的に損なうことなくアフィニティ複合体を選択的に解離させることができる。詳細な条件は個々の親和力系に大きく依存する。

アッセイにおけるルミネセンス検出の具体的方法は、導波領域表面上での直接的な分析対象物質の検出に使用される発光性物質の固定化を主要な要素とする。これらの物質は、例えば導波領域表面上で励起されてルミネセンスを発することのできる、タンパク質と結合した複数の発光体とすることができる。タンパク質

に対して親和性を有するパートナーが、この固定化された層を通過すると、ルミネセンスがそれにより変化し、親和性を有するパートナーの量の決定が可能とな

る。特に、アフィニティ複合体の双方のパートナーを発光体で標識して、例えばルミネセンスの消光を伴う双方の間のエネルギー伝達に基づき濃度の決定を行うことも可能である。

化学的または生化学的なアフィニティアッセイのためのもう1つの好適な固定化方法は、分析対象物質自体または結合パートナーの1つに対する化学的または生化学的認識要素としての1以上の特異的結合パートナーをセンサプラットホーム表面上に固定化するものである。これらのアッセイは1つ以上の段階で構成され、それらの段階において、センサプラットホーム表面上に固定化された認識要素に対する特異的結合パートナーを含有する1以上の溶液を、センサプラットホーム表面上に連続したステップとして通過させることができ、その分析対象物質はそれら部分的のステップの1つにおいて結合される。これらの分析対象物質は、アフィニティアッセイにおいてルミネセンス標識されたパーティシバントの結合によって検出される。ルミネセンス標識された物質は、アフィニティアッセイにおける結合パートナーのいずれか1つ以上であってもよく、または発光体を有する分析対象物質のアナログであってもよい。唯一の前提条件は、分析対象物質の存在が選択的にルミネセンス信号をもたらすか、または選択的にルミネセンス信号の変化をもたらす必要があるということである。

化学的に活性のセンサ表面を拡大するため、適切な方法によりセンサプラットホーム上への固定が可能な微粒子、いわゆる「ビード」に化学的または生化学的認識要素を固定化することもできる。プラスチックなど異なる物質での構成が可能なビードを使用するための必要条件は、第一に分析対象物質との相互作用が、エバネッセントフィールドの侵入深さ内で有効な程度まで進行することであり、第二に導波特性が重大な干渉を受けないことである。

原則的に、認識要素は例えば疎水吸着または共有結合により導波領域上に直接固定化するか、または表面の化学的修飾後に例えばシラン化または重合体層の付加によって固定化することができる。また認識要素の導波路上への直接的な固

定化を容易にするため、例えばSiO₂で構成される薄い中間層を付着促進層として付加することが可能である。ガラスおよび金属表面のシラン化については、

(30)

特許平11-505610

例えば「アドヴァンシズ・イン・コロイド・アンド・インクフェース・サイエンス」第6巻(L. ボクサニ、O. リアドンおよびE. コヴァツ、95-137頁(1976年))などの文献に包括的に記述されている。固定化を行なう具体的に実施可能な方法はすでに上記に記述されている。

適切な認識要素は、例えば抗原に対する抗体、免疫グロブリンに対するプロテインAおよびGなどの結合タンパク質、リガンドに対する生物学的および化学的レセプター、ヒスチジン標識されたタンパク質などのヒスチジン標識成分に対するキレート化剤、相補鎖に対するオリゴヌクレオチドおよびRNAまたはDNAの一本鎖、ビオチンに対するアビシン、酵素基質に対する酵素、酵素補因子または酵素阻害剤、炭水化物に対するレクチンなどである。適切なアフィニティーパートナーのうちどれがセンサプラットホーム表面に固定化されるかは、アッセイの構成に依存している。認識要素は自然界に存するものでもよいし、または遺伝子工学または生物工学により製造または合成してもよい。

「認識要素」および「特異的結合パートナー」という語句は、同じ意味を表わすものとして使用されている。

前記のアッセイ自体は、競合的測定法などの一段階錯化法、またはサンドイッチアッセイなどの多段階法のいずれであってもよい。

競合的測定法の最も簡単な例は、濃度が未知の分析対象物質とルミネセンス標識されている以外は同一の既知量の化合物とを包含する試料をセンサプラットホーム表面と接触させ、そこでルミネセンス標識された分子と標識されていない分子とが、それらの固定化された認識要素上の結合部位に関して競合するものである。このアッセイの構成においては、試料が分析対象物質を含有していないときに最大のルミネセンス信号が得られる。検出すべき物質の濃度が増加するにつれて、観察可能なルミネセンス信号は低下する。

競合的イムノアッセイにおいて、センサプラットホーム表面上に固定化される認識要素は抗体である必要はなく、抗原であってもよい。一般に、それらバー

トナーのどちらが固定化されるかは化学的または生化学的なアフィニティアッセイにおける選択の問題である。これは、導波領域のエバネッセントフィールドに

(31)

特許平11-505610

おける吸着質量の変化に依拠する表面プラズモン共鳴またはインターフェロメトリーなどの方法に対する、ルミネセンスに基づくアッセイの主要な利点の1つである。

さらに、競合的測定法の場合における競合は、センサプラットホーム表面の結合部位に関するものに限定される必要はない。例えば、既知量の抗原をセンサプラットホーム表面に固定化し、分析対象物質としての検出すべき未知量の同じ抗原およびルミネセンス標識された抗体を包含する試料と接触させることができる。この場合、抗体と結合するための競合は、表面に固定化された抗原と溶液中の抗原との間で起こる。

多段階アッセイの最も簡単な例は、一次抗体がセンサプラットホーム表面に固定化されるサンドイッチタイムノアッセイである。検出すべき抗原の結合および、抗原の第二次エピトープ検出のために使用されるルミネセンス標識された二次抗体の結合は、抗原を包含する溶液およびルミネセンス標識された抗体を包含する第2の溶液との連続した接触により実施するか、または抗原とルミネセンス標識された抗体とからなる部分複合体が最終的に結合されるようにあらかじめこれら2つの溶液を混合した後に実施することが可能である。

アフィニティアッセイは、さらに付加的な結合ステップを包含するものでもよい。例えばサンドイッチタイムノアッセイの場合、第1のステップにおいてプロテインAをセンサプラットホーム表面に固定化することができる。このタンパク質はそのいわゆる下部に免疫グロブリンを特異的に結合させ、それらは、上記のように実施可能なその後のサンドイッチアッセイにおいて一次抗体として作用する。

アフィニティアッセイには、既知のアビシン-ビオチン親和力系を用いるものなど他に多くの方法がある。

アフィニティアッセイの方法の例は、J. H. リッテンバーグ (Rittenburg) 「イムノアッセイの原理 (Fundamentals of Immunoassay)」、

「食品分析に関するイムノアッセイの開発と応用 (Development and Application of Immunoassay for Food Analysis)」 (J. H. リッテンバーグ編、エルス

ヴィア (Elsevier) 、エセックス (Essex) (1990年)) 、またはP. ティーセン (Tijssen) 「酵素イムノアッセイの実際と理論 (Practice and Theory of Enzyme Immunoassays)」 (R. H. バードン (Burdon) 、P. H. ヴァン・ニッペンバーグ (P.H. van Knippenberg) 編、エルスヴィア、アムステルダム (Amsterdam) (1985年)) に見られる。

本発明のさらなる対象は、本発明によるセンサプラットホームまたは変形されたセンサプラットホームを用いて1以上のルミネセンスを並列的に決定する方法であり、この方法は1以上の液体試料をセンサプラットホーム上の1以上の導波領域と接触させることと、励起光を導波領域に入射させることと、励起光を導波領域内に透過させることと、それにより試料中の発光物質または導波領域上に固定化された発光物質をエバネッセントフィールド内において並列的に励起することと、それにより発生したルミネセンスをオプトエレクトロニクス装置を用いて測定することとを包含している。

センサプラットホームおよび変形されたセンサプラットホームに関する上記の好適な構成は本方法にも適用される。

ルミネセンス励起に適しているのは実質的に平行な光線だけである。「実質的に平行」とは、本発明の文脈においては5度未満の發散を意味するものと理解されるべきである。これは、その光線がわずかに發散しているか、またはわずかに収束していてもよいことを意味する。ルミネセンス励起のためにはコヒーレント光の使用が好ましく、波長が300ないし1100 nmのレーザ光が特に好ましく、450ないし850 nmがさらに好ましく、480ないし700 nmが最も好ましい。

使用可能なレーザの例は、ダイレーザ、ガスレーザ、固体レーザ、および半導体レーザである。必要な場合、放射波長を非線形結晶光学装置により倍加することもできる。光学素子を用いて、ビームをさらに集束させるか、偏光させるか、またはニュートラルグレーフィルタにより減衰させることもできる。特に適したレーザは457ないし514 nmおよび543ないし633 nmの波長でそれぞれ放射を行なうアルゴン/イオンレーザおよびヘリウム/イオンレーザである。さらに適しているのは、630ないし1100 nmの基本波長で放射を行なう半導体材料製のダ

イオードレーザまたは周波数を二倍にしたダイオードレーザであり、その理由は、それらの寸法が小さくまた電力消費量が低いために、センサシステム全体の実質的な小型化が可能となるからである。

「試料」とは、本発明の文脈においては、検出すべき物質、すなわち分析対象物質を包含している可能性のある分析すべき溶液全体であると理解されるべきである。この検出は、一段階または多段階のアッセイにより実施可能であり、このアッセイ中にはセンサプラットホームの表面が1以上の溶液と接触させられる。使用される溶液のうち少なくとも1つは、本発明に従って検出が可能な発光物質を包含している。

発光物質がすでに導波領域上に吸着されている場合には、試料は発光成分を含んでいなくてもよい。この試料は、pH緩衝液、塩、酸、塩基、界面活性剤、粘性調整添加剤、染料などの成分をさらに含有していてもよい。特に、生理的塩類溶液を溶媒として使用することができる。発光成分がそれ自体液体である場合、溶媒の添加は省略することができる。この場合、試料中の発光物質の含有率を100%にすることが可能である。

また試料は、卵黄、体液またはその成分、特に血液、血清、血漿、尿などの生物学的媒質であってもよい。また表面水、土や植物の一部などの天然または合成による媒質からの抽出物溶液、生物学的プロセスによる酒または合成酒であってもよい。

試料は希釈せずに使用してもよく、または添加された溶媒とともに使用してもよい。

適切な溶媒は水、水性緩衝液、タンパク質溶液および有機溶媒である。適切な有機溶媒はアルコール、ケトン、エステルおよび脂肪族炭水化物である。水、水性緩衝液、または水と混和性の有機溶媒との混合物の使用が好ましい。

しかしながら、試料は、顔料粒子、分散剤、天然および合成によるオリゴマーまたは重合体など、溶媒に溶解しない成分を包含してもよい。この場合、試

料は光学的に不透明な分散またはエマルジョンとなる。

発光化合物としては、ルミネセンスの波長が330ないし1000nmの範囲にある

機能化された発光染料、例えばローダミン、フルオレセイン誘導体、クマリン誘導体、ジスチリルフェニル、スチルベン誘導体、フタロシアニン、ナフタロシアニン、ポリビリジル／ルテニウム錯体（トリス（2, 2'-ビビリジル）ルテニウム塩化物、トリス（1, 10-フェナントロリン）ルテニウム塩化物、トリス（4, 7-ジフェニル-1, 10-フェナントロリン）ルテニウム塩化物、ポリビリジル／フェナジン／ルテニウム錯体など）、白金／ポルフィリン錯体（オクタエチル-白金-ポルフィリンなど）、永続性ユロビウムおよびテルビウム錯体、シアニン色素などを使用することができる。血液または血清の分析に特に適しているのは、吸収波長および放射波長が600ないし900 nmの範囲にある染料である。

さらに適しているのは、フルオレセイン誘導体などの染料であってその染料の共有結合を可能にする官能基を含有する染料であり、例えばフルオレセインイソチオシアナートなどがある。

同様に適しているのは、例えば単官能および二官能のC y 5.5（登録商標）染料など、バイオロジカル・ディテクション・システムズ社（Biological Detection Systems Inc.）から商業的に入手可能な機能性蛍光染料であり、これらは例えば「クリニカル・ケミストリー（Clinical Chemistry）」40（9）：1819-1822頁（1994年）に記述されている。

好適なルミネセンスは蛍光である。

すべて同じ波長の光により励起可能であるが放射波長が異なるさまざまな蛍光染料を使用すると、特に出射グレーティングを用いる場合に有利なことがある。

使用される発光染料は、重合体または、生化学的な親和力系における結合パートナーの1つと化学的に結合していてもよく、それら結合パートナーの例は、抗体または抗体フラグメント抗原、タンパク質、ペプチド、レセプターまたはそれらのリガンド、ホルモンまたはホルモンレセプター、オリゴヌクレオチド、DNA鎖およびRNA鎖、DNAまたはRNAのアナログ、プロテインAおよび

Gなどの結合タンパク質、アビシンまたはビオチン、酵素、酵素補因子または酵素阻害剤、レクチンまたは炭水化物などである。可逆的または不可逆的な（生）

化学的アフィニティアッセイには、最後に言及した共有ルミネセンス標識の使用が適している。ルミネセンス標識されたステロイド、脂質およびキレート化剤を使用することも可能である。特にDNA鎖またはオリゴスクレオチドによるハイブリダイゼーションアッセイの場合、挿入発光染料が、特に、さまざまなルテニウム錯体と同様、それらの染料が挿入されると増強されたルミネセンスを示す場合に特に適している。それらのルミネセンス標識された化合物が、センサプラットホーム表面に固定化されたそのアフィニティパートナーと接触させられると、それらの結合を、測定されたルミネセンス強度を用いて容易に定量することができる。また、例えば酵素によるルミネセンスの消光またはタンパク質の立体配座の変化に起因するルミネセンスの増強という形で試料が発光体と相互作用する際のルミネセンスの変化を測定することにより、分析対象物質の定量を行なうことができる。

本発明による方法では、試料が静止しているときに導波領域と接触させるか、または試料を連続して導波領域上に通過させ、その循環を断続させることができる。

本方法が適用される別の重要な形態は、第一に、再結合が信号検出にも用いられる場合、信号の発生を導波路のエバネッセントフィールド内に制限することに基づいており、第二に、平衡プロセスとしてのアフィニティによる複合体形成の可逆性に基づいている。貢流系において適切な流量を用いると、エバネッセントフィールド内の結合したルミネセンス標識アフィニティパートナーの結合または脱離、すなわち解離をリアルタイムでたどることができる。そのためこの方法は、さまざまな会合定数または解離定数を決定するための速度論的研究または置換分析に適している。

消散的に励起されたルミネセンスは既知の方法により検出可能である。適切なものは、フォトダイオード、フォトセル、光電子増倍管、CCDカメラ、CCDの行列などの検出器アレーである。ルミネセンスは、鏡、プリズム、レンズ、

フレネルレンズ、グレーデッドインデックスレンズなどの光学素子により前記検出器アレー上に投射することが可能であり、これらの素子は個々に、または列状

に配置することができる。放射波長を選択するため、フィルタ、プリズム、モノクロメータ、ダイクロイックミラー、回折格子など既知の素子を使用することが可能である。

特に、相対的に多数の物理的に独立した特異的結合パートナーが存在する場合、センサプラットホーム直近に配列された検出器アレーを使用することが有利である。センサプラットホームと検出器アレーとの間には、励起光とルミネセンス光とを分離するためのホログラフィックフィルタや干涉フィルタなどの光学素子を配置すると好都合である。

本方法のある形態は、等方に放射され消散的に励起されたルミネセンスを検出するものである。

本方法のもう1つの形態では、消散的に励起され導波領域内に再結合されたルミネセンスはセンサプラットホーム縫部において、または出射グレーティングを介して検出される。この再結合されたルミネセンスの強度は意外なほど高く、その結果、この手順を用いて非常に良好な感度を得ることができる。

本方法のもう1つの形態では、消散的に励起され等方に放射されたルミネセンスおよび導波路内に再結合されたルミネセンスの双方が相互に独立に、しかし同時に検出される。発光体と導波領域との距離の関数である、これら2つのルミネセンス検出方法の選択性が異なるために、この形態による方法を用いると、発光体の物理的分布に関する付加的な情報を得ることができる。また発光体の光化学的漂白と発光体を担持するアフィニティ複合体の解離とを識別することが可能になる。

本方法のもう1つの利点は、ルミネセンスの検出の他に、放射された励起光の吸収も同時に測定できるということである。ファイバオプティクスまたは平面による構成の多重モード導波路と比較して、この場合は実質的に良好な信号対雑音比が得られる。ルミネセンスの消光効果は、ルミネセンスおよび吸収の同時測定により高感度で検出することができる。

本方法は、連続波(c w)の作用によって励起光放射を行なうことにより実施することが可能である。すなわち、強度が時間に対して一定であるところの光を

用いて励起が行なわれる。

しかしながら本方法は、例えば1ピコ秒から100秒までのパルス長をもつタイムドパルスとして励起光を放射し、パルス長が短い場合は時間分解的に、または秒単位から分単位の間隔をおいてルミネセンスを検出することによっても実施可能である。この方法は、例えば結合の形成速度を解析的に追跡すべき場合、または光化学的漂白に起因するルミネセンス信号の低下を露光時間を短くすることにより防止すべき場合に特に有利である。さらに、適度な短さのパルス長を用い、検出に関して適切な時間分解を行なうと、(この場合はできる限り持続性)の標識分子のルミネセンスにより存在している可能性のある試料またはセンサ材料の望ましくない発光成分の散乱光、ラマン放射および一時的なルミネセンスの判別が可能となる。その理由は、分析対象物質の放射は、一時的な放射が減衰したときにのみ検出されるからである。さらに、パルス励起後の時間分解されたルミネセンス検出、また変調された励起および検出により、分子ルミネセンスの減衰動態に対する分析対象物質の結合の影響を調べることが可能となる。分子ルミネセンスの減衰時間は、固定化された認識要素と導波路のエバネッセントフィールド内への信号発生の物理的限界とによる特定の分析対象物質の認識と並んで、さらなる選択性の基準として用いることができる。

本方法は、強度変調方式により1つ以上の周波数で励起光を放射し、試料のルミネセンスにおける結果的な移相および変調を検出することにより実施することができる。

複数の導波領域内への励起光の並列的入射はいくつかの方法で実施することが可能である：

a) 複数のレーザ光源を使用するか；

b) レーザ光源からのビームを既知の適切な光学装置により拡げて、複数の導波領域および入射グレーティングを覆うようにするか；

c) レーザ光源からのビームを回折素子またはホログラフィ光学素子を用い

て複数の個別のビームに分割し、それらのビームをグレーティングを介して導波領域に入射させるか；または

d) 固体レーザの配列を使用する。

時間遅れを伴って導波領域に関する入射または出射を行なうために使用可能な、制御自在の偏光鏡を用いることにより有利な手順が実現される。別の方法として、センサプラットホームを適切に変位させることもできる。

もう1つの好適な方法は、同一または異なる波長のさまざまなレーザ光源によってルミネセンスを励起するものである。

ルミネセンス励起のため一列のダイオードレーザ（レーザアレー）を使用することが好ましい。それらの部品は、非常に小型で経済的に製造でき、個々のレーザダイオードが個別に制御できるという特別な利点を有している。

センサプラットホームに関して記述された好適な構成は蛍光による検出方法の場合にも適用される。

図6は実施可能な全体的構成を示す線図である。参照符号1および3は上記で定義した通りであり、他の参照符号は以下の通りである：

- 8 センサプラットホーム
- 9 フィルタ
- 10 シール
- 11 貫流セル
- 12 試料スペース
- 13 励起用光学素子
- 14 検出用光学素子／電子装置

例えばダイオードレーザ13からの励起光は第1グレーティング3を介してセンサプラットホーム8の導波領域1に入射させられる。貫流セル11はセンサプラットホーム8の下側にあってセンサプラットホームに対し緊密に押圧されている。アッセイのために必要な溶液は、1個以上の入口開口部と1個以上の出口開口部とを有する貫流セル11内のスペース12を通流させられる。結合パート

ナーの蛍光は導波領域内に消散的に再結合され第2グレーティング3'を介して検出器14に対して出射され検出器14において検出される。フィルタ9は散乱光を遮光して除くように作用する。

この方法は、好ましくは卵黄、血液、血清、血漿または尿などの試料を分析するためには用いられる。

もう1つの好適な方法は、表面水、土壤または植物の抽出物、生物学的プロセスまたは合成プロセスによる酒などの試料の分析において得られる。

本発明は、アフィニティセンシングにおける生物学的物質の定量のための、本発明によるセンサプラットホームまたは変形されたセンサプラットホームの使用にも関係する。

信号の発生および検出は導波路の化学的または生化学的認識表面に限定され、媒質からの外乱信号は識別されるので、固定化された認識要素に対する物質の結合はリアルタイムで追跡可能である。したがって、適切な流量による貢流系での会合速度および解離速度の直接的測定により、アフィニティスクリーニングまたは置換分析、特に薬品開発において本発明による方法を用いることも可能である。

本発明は、

a) 抗体または抗原の定量のための本発明によるセンサプラットホームまたは変形されたセンサプラットホームの使用と；

b) レセプターまたはリガンド、オリゴヌクレオチド、DNA鎖またはRNA鎖、DNAまたはRNAのアナログ、酵素、酵素基質、酵素補因子または酵素阻害剤、レクチンおよび炭水化物の定量のためのセンサプラットホームまたは変形されたセンサプラットホームの使用と；

c) 光学的に不透明な流体における発光成分の選択的定量のための本発明によるセンサプラットホームまたは変形されたセンサプラットホームの使用と；を包含する。

光学的に不透明な流体は、例えば卵黄などの生物学的流体、血液、血清、血漿などの体液、また表面水、溶解した土壤抽出物、溶解した植物抽出物などの環境分析試料であってもよい。また適切なものは、例えば化学製品の製造において

得られるような反応溶液、特に染料溶液または光学的増白剤の反応溶液である。また適切なものは、例えば繊維産業において使用されるすべての種類の分散およ

の調合剤であって、1以上の発光成分を包含するものである。したがつて、この方法は品質管理にも用いることができる。

以下の諸例は本発明を説明するものである。

以下の諸例のすべてにおいて、濃度の単位Mはモル／Lを示す。

例A：さまざまなセンサプラットホームの作製

例A 1 蒸着においてマスクを用いる作製

ポリカーボネート(PC)基板を蒸着によりTiO₂でコーティングする(方法:スパッタリング、蒸着速度:0.5Å/秒、厚さ:150nm)。目標と基板との間の基板の直近には、長さ30mmで幅0.6mmの6個のストリップがカットされたアルミニウム製のマスクが導入される。この結果作成された6つの導波領域(測定領域)は、幅が600μmの中央部において150nmの均一な厚さをもつ台形断面を有しており、層の厚さは両側で鏡面状に(徐々に)減少している。前記中央部における層の厚さが最も大きく、そのため有効屈折率は中央部において最も高くなるので、入射するレーザ光は導波領域内に制限される。

例A 2 二次的分割による作製

193nmのArFエキシマーレーザを使用して操作を行なう。方形のレーザビームを円柱レンズを用いて、センサプラットホーム上に焦点を合わせた幅200μm長さ20mmのビームプロファイルに集束させる。センサプラットホームは連続した100nm厚のTa₂O₅層を備えている。1J/cm²を上回るエネルギー密度において、層全体は單一レーザパルス(10ns)により削除される。

例A 3 二次的分割による作製

488nmのArイオンレーザを使用して操作を行なう。円形のレーザビームを顕微鏡レンズ(40倍)を用いて、導波層上に焦点を合わせ直径4μmまで集束

させる。センサプラットホームは連続した100nm厚のTa₂O₅層を備えており、モータ制御された位置決めステpper(ニューポート(New Port)PM500)上に配置される。連続したレーザ照射のもとで、プラットホームをビームと垂直方向に毎秒100mmで移動させる。700mWの出力により、導波層全体を焦点において削除し、それにより2つの独立した導波領域を形成する。

(41)

特許平11-505610

例A 4 真空法による構成された吸収被覆層の付加による作製

層状のクロム／金による5枚の平行なストリップを、 Ta_2O_5 で構成された（連続した）金属酸化物導波路上に最初の5 nmをCrにより0.2 nm／秒で、その後45 nmをAuにより0.5 nm／秒で真空蒸着する（真空蒸着装置：バルザース（Balzers）BAK400）。入射モードは吸収層により中断される。

例A 5 水性法による構成された吸収被覆層の付加による作製

Ta_2O_5 で構成された（連続した）金属酸化物導波路の表面を180°Cの気相における（メルカプトメチル）ジメチルエトキシシランでシラン化する。ファインピベットにより、コロイド溶液A（オーリオン（Aurion）の供給するゴールドゾル（GoldSol）、平均コロイド直径28.9 nm、濃度： $As_{20} \approx 1$ の水溶液）を液滴状またはストリップ状にして修飾された表面に加え、1時間インキュベートする。インキュベート後、表面を水で洗浄する。導波モード光をインキュベートされた部位に吸収させる。インキュベートされた部位の下流側にはモード光はもはや存在しない。同じことが、プロテインAで覆われたA uコロイド溶液B（シグマ（Sigma）の供給するP-9785、平均直径18.4 nm、 $As_{20} \approx 5.5$ （クリセロール50%、0.15M NaCl、10 mMリン酸ナトリウム（pH 7.4）、PEG 20 0.02%、アジ化ナトリウム0.02%））に適用される。導波表面上の吸収パターンは、水およびエタノールによる数度のフラッシング後でも損なわれない。これは形成された構成の安定性を示すものである。

コロイド溶液Aのマイクロドロップ（1 μl）列を手操作で加えることにより、連続した光吸収ストリップを形成することができる。

例A 6 水性法による構成された吸収被覆層の付加による作製

TiO_2 で構成された（連続した）金属酸化物導波路の表面を50°Cの気相における（メルカプトメチル）ジメチルエトキシシランでシラン化する。その後、第2出射グレーティングの前方および第2出射グレーティングを含む導波表面の一部を、コロイド溶液B（シグマ（Sigma）の供給するP-9785、平均直径18.4 nm、 $As_{20} \approx 5.5$ （クリセロール50%、0.15M NaCl、10 mMリン酸ナトリウム（pH 7.4）、PEG 20 0.02%、アジ化ナトリウム0.02%））とともに3時間

インキュベートする。インキュベートされた部位における波の伝搬は完全に遮断される。インキュベートされた部位の表面を原子間力顕微鏡で調べ、コロイドの存在および、観察される光吸収のために必要な、表面に固定された金粒子の密度を判定する。それら粒子の平均的間隔は約100nmである。

例A7 水性法による構成された吸収被覆層の付加による作製

Ta_2O_5 で構成された（連続した）金属酸化物導波路の表面を（メルカプトメチル）ジメチルエトキシシラン（180°Cの気相）でシラン化する。平行な、流体工学的に分離した層分流を伴う貫流セルに導波路チップを接合する。ここでは流体による5つまでの異なる流れを、個別にアドレス可能な独立したフロー開口部（1-5）を通じ、導波表面の長手方向に沿い相互に近接平行させて通過させることができる。その目的は、付着したAuコロイドによる2つのより細いストリップで分離された3つの導波路ストリップを作製することにある。貫流セルには入口1、3および5において緩衝液（リン酸塩で緩衝処理された塩化ナトリウム溶液（pH7.0））を充填し、入口2および4においてAuコロイド溶液を充填する。表面がウシ血清アルブミン（オーリオンの供給するB SAゴールドトレーサ（Gold Tracer）、平均コロイド直径25nm、OD₅₂₀≈2.0）でブロックされたコロイド溶液を使用する。（流路毎の）選択される流量は、緩衝液流1、3および5については0.167ml／分、2つのコロイド流2および4については0.05ml／分である。その結果、コロイド流の幅は約1mm、緩衝液流の幅は

約3mmとなる。一般に、緩衝液流の幅に対するコロイド流の幅の比は、流量の比を介して自由に選択することが可能である。

これらの流れは（流路当たり1mlのコロイド量に相当する）20分間加えられる。20分間のインキュベート後、導波路チップを取り除き、水で洗浄し、空素流で乾燥させる。導波モード光は、コロイドで固定化されたストリップにより完全に吸収され、幅約3mmの3つの独立した光導波モードがもたらされる。

適用例B

例B1：ハイブリダイゼーションアッセイにおける、2つの物理的に独立した領域に固定化された相補鎖をもつ2つのフルオレセンス標識された異なるオリゴヌクレオチド

(43)

特許平11-505610

クロオチドの並列的検出

B 1. 1 例A 3により得られる、2つの導波領域をもつ光センサプラットホーム

寸法: 16mm × 48mm × 0.5mm

導波層: T a: O_x、488nmにおけるn = 2.317、厚さ150±5 nm

基板: コーニングガラス (Corning Glass) C 7059、488nmにおけるn = 1.538

グレーティング: 変調深度6~7 nmの方形グレーティング、グレーティング周期: 750 nm

633 nmでの励起による入射結果

結合角度: 4° ~ 5° (二次回折)

入射効率: グレーティング位置において7%

減衰: 2.5 dB/cm

B 1. 2 光学的设计

アルゴンイオンレーザ (励起波長488 nm) からの励起光が円柱レンズを用い

て10mmまで拡げられ、回転自在な鏡により基板の背面から導波領域の2つのグレーティング上に向けられる。容積約0.07mlで2つの導波領域にわたって延びる、サーモスケットで封緘された貴賓セルが上方から導波層の上面に対し押圧されておりOリングによりシールされている。エバネッセントフィールドにおいて励起された2つの試料のルミネセンスは2個の物理的に独立した検出器により同時に記録される。これら2個の検出器はそれぞれフォトダイオード (S R 1133ハママツ (Hamamatsu)) で構成されており、セル空間内に放射されたルミネンスは、干渉フィルタを用いたフィルクリーリングを行なうとともに同一のガラス光ファイバによりフォトダイオード上まで導波される。これらの信号は2基のトランスインピーダンス増幅器により増幅される。

この設計に使用される個々の素子は既知のものであり、商業的に入手可能である。

B 1. 3 使用される溶液

1) 0.069Mリン酸塩緩衝液 (0.041M Na₂HPO₄+0.028M NaH₂PO₄)

(44)

特許平11-505610

、0.176M KCL、POE-(20)ソルビトールモノラウレート(トゥイーン(Tween) 20、ICL) 1mI、ポリアクリル酸PAA5100 1g、アジ化ナトリウム500mg／Iを蒸留水で1リットルに調製したもの、で構成されるハイブリダイゼーション緩衝液(pH7.75)

2) 試料溶液1 (16×cfl) : 第1導波領域に固定化されたオリゴマーと相補的な¹⁶S塩基対(ハイブリダイゼーション緩衝液1中のフルオレセイン-5' - GT T G T G T G G A A T T G T G - 3' (10⁻⁶M))で構成されるフルオレセイン標識されたオリゴマー

3) 試料溶液2 (15×cfl) : 第2導波領域に固定化されたオリゴマーと相補的な¹⁵S塩基対(ハイブリダイゼーション緩衝液1中のフルオレセイン-5' - TT T T C T C T C T G T G - 3' (10⁻⁶M))で構成されるフルオレセイン標識されたオリゴマー

4) 再生溶液: 原素の50% (重量比) 水溶液

上記の溶液はカブロ(Cavro)ポンプにより供給される(各例においてピュレット量で10mI)。

B 1. 4 固定化方法

オリゴスクレオチド合成装置(アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems) 394B)を使用し、粒子上のオリゴスクレオチド合成において標準的な方法により3-グリジロキシプロビルトリメトキシシランでシラン化されたセンサプラットホーム上で直接、特異的結合パートナー(第1導波領域上では3' C A A C A C A C C T T A A C A C - 5'、第2導波領域上では3' A A A A A G A G A G A G A G A)を合成する。しかし標準的な合成方法とは対照的に、オリゴスクレオチドの3'末端における表面への固定化には、安定的なヘキサエチレンジグリコールリンカーが用いられる。特異的結合パートナーを固定化したセンサプラットホームを水で洗浄し、その後、アッセイに使用する。

B 1. 5 測定手順

測定方法の変形1(2つの異なる分析対象物質を時間的に前後させて、2つの導波領域上に同時に加えるもの)は、以下の各ステップで構成される:

(45)

特許平11-505610

- ・ハイブリダイゼーション緩衝液1) で2分間洗浄を行ない (0.5m l／分) 、背景信号を記録する：
- ・試料溶液2) を10分間加える (0.5m l／分) (5m l／分で5秒間フラッシングの後) :
- ・ハイブリダイゼーション緩衝液1) で2分間フラッシングする：
- ・再生溶液4) を3分間加える (0.5m l／分) :
- ・ハイブリダイゼーション緩衝液1) で4分間フラッシングする：
- ・試料溶液3) を10分間加える (0.5m l／分) (5m l／分で5秒間フラッシングの後) :
- ・ハイブリダイゼーション緩衝液1) で2分間フラッシングする：
- ・再生溶液4) を3分間加える (0.5m l／分) :
- ・ハイブリダイゼーション緩衝液1) で2分間フラッシングする。

前記2つの導波領域からの等方的に放射された蛍光を、センサプラットホーム直下に配置された入口断面が方形 (10mm×1mm) のライトガイドバンドルにより前記手順の間に集光する。これらライトガイドバンドルの方形断面は出口が円形 (直径6mm) となるように変形されている。ライトガイドバンドル出口の下流側直近には同種の干渉フィルタ (530nmで透過率最大、バンド幅30nm) が配設されている。スペクトル連続された蛍光光を2つのフォトダイオードにより測定する。フルオレセイン標識された16-mer相補性試料を10分間加えた後、第1導波領域からは42mVの蛍光信号が観測され、第2導波領域 (1mV) からは信号が観測されない。これに対し、フルオレセイン標識された15-mer相補性試料を10分間加えた後、第2導波領域では43mVの蛍光信号が測定され、第1導波領域では信号が測定されない (0mV)。信号ノイズは約2mVである。

測定方法の変形II (独立したセルを用いて2つの異なる分析対象物質を2つの物理的に独立した導波領域に同時に加えるもの) は、以下の各ステップで構成される：

- ・双方の導波領域でハイブリダイゼーション緩衝液1) により2分間洗浄を行ない (0.5m l／分) 、双方の流路における背景信号を記録する：

(46)

特許平11-505610

- ・（5m l／分で5秒間フラッシングの後）試料溶液2）（0.5m l／分）を第1導波領域に、また試料溶液3）（0.5m l／分）を第2導波領域に、10分間加える；
- ・ハイブリダイゼーション緩衝液1）で2分間双方の導波領域をフラッシングする；
- ・再生溶液4）（0.5m l／分）を双方の導波領域に3分間加える；
- ・ハイブリダイゼーション緩衝液1）で4分間双方の導波領域をフラッシングする。

前記2つの導波領域からの等方的に放射された蛍光を、センサプラットホーム直下に配置された入口断面が方形（10mm×1mm）のライトガイドバンドルにより前記手順の間に集光する。これらライトガイドバンドルの方形断面は出口で円形（直径6mm）となるように変形されている。ライトガイドバンドル出口の下流側直近には同種の干渉フィルタ（530nmで透過率最大、バンド幅30nm）が配設されている。スペクトル透過光された蛍光を2つのフォトダイオードにより測定する。双方の導波領域から明瞭な信号が得られる。

例B 2：5つの平行なストリップ上での認識要素の検出

B 2. 1 認識要素の固定化

C y 5.5で標識されたヒトの抗体、プロテインAおよびBSAを、例A 4で記述されたセンサプラットホームの5つの領域のストリップに認識要素および対照分子として固定化する。

すべての認識要素に関する分析対象物質は、プロテインAのストリップとのみアフィニティ反応を示すC y 5.5で標識されたヒト抗体である。

すべてのストリップは0.6mm×15mmであり、ストリップの間隔は0.6mmである。これらのストリップは、遮蔽した入射グレーティングから右方1mmの位置を起点としている。

センサプラットホーム表面上への認識要素および対照分子の構成された固定化のため、以下の寸法による多重流路セルを使用する。幅0.6mm×長さ15mmで深さが使用されるセンサプラットホームの寸法と同じ6つの流路が、テフロンの

(47)

特許平11-505610

直方体（寸法：100mm×60mm×18mm）内に形成されている。流路の両端のテフロン内には、0.6mmドリルを用いてドリルホールが形成されており、テフロンブロックの下側から個々の流路に連絡するようになっている。テフロン内に形成された流路の特殊な形状および流路周囲の選択された形状により、それら流路は、導波路のための陥凹部から約0.2mm突出する「リップ」形状をなしている。表面をあらかじめ3-メルカブロビルージメチルメトキシシランを用いた気相シラン化により化学的に修飾した導波層を、導波層が流路と対向する

ように多重流路セルの陥凹部内に配置する。センサプラットホームを多重流路セルのテフロンのリップに対し押すことにより、導波領域の表面とテフロンブロックとの間にシールされた接合部が形成される。以下の溶液をドリルホールを介して個々の流路内に注入する。

流路1：C y 5.5標識されたヒト抗体の溶液 1 nM

流路2：プロテインA-水 1 mg/ml

流路3：B S A-水 10mg/ml

流路4：プロテインA-水 1 mg/ml

流路5：プロテインA-水 1 mg/ml

流路6：使用せず

2時間のインキュベート期間後、脱塩水を注入することにより流路を洗浄し、窒素を吹き込むことにより乾燥する。その後センサプラットホームを多重流路セルから取り外し、導波路表面を濃度10mg/mlのB S A溶液約400μlで浸潤して、シラン化表面上の残余の活性結合部位をタンパク質(B S A)で飽和させる。B S Aは、この実験で分析対象物質として使用されるC y 5.5標識されたヒト抗体に対して親和性を示さない。2時間のインキュベート期間後、センサプラットホームを、脱塩水で洗浄する。

B 2. 2 認識要素および、ストリップに固定化されたその結合パートナーに関する自動的蛍光測定のための実験構成

この測定の構成は以下の3つの主要な要素からなっている。

A) 導波領域とさまざまな溶液との液体接触のための一體化された貢流セルを備

- えたセンサプラットホームのための、垂直方向に調整可能な保持手段
 B) 励起光ビームを形成するためのレーザ光源と光学素子とのための保持手段を備えた光学装置
 C) レンズの組合せとメカニカルスクリーンにより導波路表面のストリップ状領域を検出器上に投影する光学的装置

このフローセルは、コンピュータ制御された並進および回転ユニット上に、入射グレーティングが回転ユニットの回転軸直上に位置するように取り付けられる。並進ユニットを用いて、フローセルを導波路とともにこの回転軸に沿って位置させることができ、それにより、導波路に固定化された5つの分子ストリップの領域にモードを入射させることができる。

このフローセルは基本的に、寸法が $75\text{mm} \times 40\text{mm} \times 5\text{mm}$ のアルミニウム板で構成されており、その中心にはOリングが嵌め込まれ、センサプラットホームをOリングに対し押圧することにより、寸法が $28\text{mm} \times 6\text{mm} \times 0.2\text{mm}$ の浅いチャンバが形成される。流体接触のため、アルミニウムにドリルで開けられた直径 1mm の3つのホールを通じてこのチャンバとの連絡が可能である。これらドリルホールのうち2つはフローセルへの入口として作用するもので、チャンバ内側の端面中央に形成されている。センサプラットホームがOリングに対し押圧されると、センサプラットホームの2個のグレーティングは、これらフローセルへの入口の間に位置する。第3のドリルホールはフローセルの出口として作用し、入射グレーティングがフローセルの入口の一方と出口との間に対称的に位置するように配置されている。緩衝液は入射グレーティング側の入口を通じてセル内に注入され、分析対象物質は出射グレーティング側の入口を通じてフローセル内に注入される。この構成により、分析対象物質の溶液成分による入射グレーティングの汚染が防止される（向流の原理）。

導波路とフローセルとのシール接合は、フローセルに嵌め込まれたOリングにより実現される。フローセル内の媒質はホース接続により向流の原理を用いて入れ替えることができる。

収束光ビームを形成するため、ダイオードレーザが使用される。このレーザ光

(49)

特許平11-505610

学装置から発する直径0.4mmのレーザビームはセンサプラットホームの端面と常に直角をなしている。偏光子および $\lambda/2$ プレートを用いて、このレーザビームの強度および偏光を調整することが可能である。波長670nmの帯域フィルタは、検出すべき蛍光体の波長範囲(690~740nm)においてダイオードレーザにより放射され蛍光検出を妨げるフォトンを取り除く。このレーザビーム

と導波路の長軸とがなす角度は、回転要素を用いて自由に調節可能であり、それによりTE0モードの入射角度が調節されるようになっている。検出用光学装置(C)は導波路の長軸に沿った側面の中心にTE0モードのレベルで焦点が合わされており、検出器上に導波路表面のモードの像を形成する。検出器直前のストリップスクリーンにより、ストリップに固定化された分子の外形に対応する領域(すなわち0.6mm×15mmの領域)のみが投影される。選択される検出用光学装置は、導波路表面の1:1の像を検出器の面に形成するようなものである。フィルタの組合せにより、励起光を実質的に除去し、事实上蛍光フォトンのみを検出器に向けて通過させる(2×通過率725nm)。

B 2. 3 マルチブルアッセイの実施

最初にフローセルをPBS7.0で満たし、回転ユニットを用いて入射角度を調整する。

以下の溶液を測定サイクル毎にフローセルを通じて追続的に注入する：

- 1) 洗浄緩衝液 PBS7.0 1ml、流量500 μ l/分
- 2) 分析対象物質-10 μ MのCg5.5で標識されたヒト抗体 1ml、流量250 μ l/分
- 3) 洗浄緩衝液 PBS7.0 1ml、流量250 μ l/分
- 4) カオトロピック緩衝液(グリシン、pH2.6) 1ml、流量250 μ l/分
- 5) 洗浄緩衝液 PBS7.0 1ml、流量500 μ l/分

向流：PBS7.0 5ml、流量300 μ l/分

コンピュータ制御されたマルチブルバルブおよびピストンポンプを使用し、15分の測定サイクルの間、上記種々の溶液を上記の順序および流量によりフローセル内に通流させる。

最初に、フローセルの垂直位置を並進ユニットによって調整し、導波路表面の上流側領域にモードが正しく取まるようにする。この領域には、C y 5.5で標識されたヒト抗体があらかじめ固定化されている。このストリップはレーザビームによる励起の結果、永久的な蛍光性を帯びているので、光子計数器が最大値を示すように垂直位置を調整する。これにより、固定化されたC y 5.5標識されたヒト抗体の位置が識別される。

その後、自動測定を開始する。この測定では、固定化されたストリップの間隔に対応する、並進ユニットによるフローセルの垂直位置の増分変化により、5つのストリップを上記順序1から5に従って8秒周期により1つづつ上方へ移動させて、検出器の焦点に合わせる。上記の形状により、T E 0モードは前記選択された領域のみに形成される。

フローセルが導波路とともに1箇所に保持されている間に、前記選択された領域で光子計数器により1秒間測定された値が時間の関数として記録される。

導波路の5つの異なる領域間ににおけるこの自動的往復運動は全体で15分の測定期間にわたって継続される。この期間中、上記の溶液は適正な流量により測定セルを通流する。得られたデータは時間の関数として表示することができる。C y 5.5標識されたヒト抗体が固定化されている領域（ストリップ／流路1）は、測定サイクル全体にわたって蛍光を発し、分析対象物質として測定セル内に注入されたC y 5.5標識されたヒト抗体の10⁻⁹ M溶液と相互作用を示さない。プロテインAがあらかじめ固定化されているセンサプラットホームの領域2、4および5の場合、蛍光信号の出発値の4ないし5倍までの増大が150秒後に開始される。この増大の開始は、分析対象物質がフローセル内に注入される時点と相互に関連している。これらの流路における信号は、400秒後に洗浄緩衝液1 mlを流量250 μl／分でフローセルに通流させても高い値のまま事实上変化しない。この挙動は、プロテインAと標識された抗体との特異的結合と一致している。センサプラットホームの領域3には、B S Aが対照標準としてあらかじめ固定化されている。予想されるように、このストリップ／流路は、分析対象物質として使用されるC y 5.5標識されたヒト抗体がB S Aと非特異的にしか反応しないので、測定の

(51)

特許平11-505610

間非常に低い値を示す。

【図1】

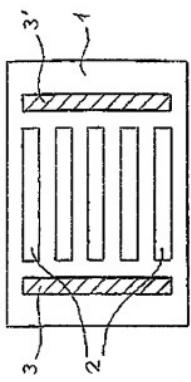


Fig. 1 b)

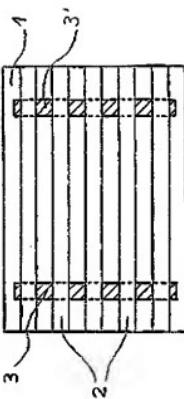


Fig. 1 d)

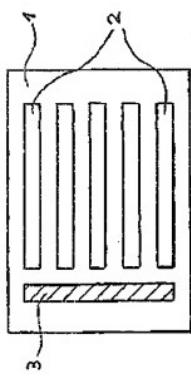


Fig. 1 a)

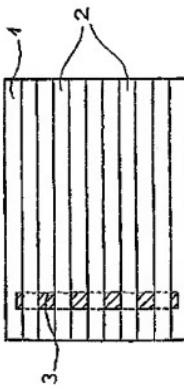


Fig. 1 c)

(52)

特表平11-505610

[図2]

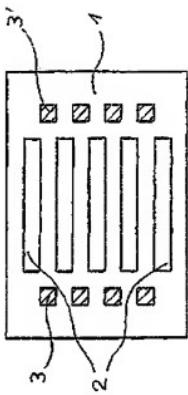


Fig. 2 b)

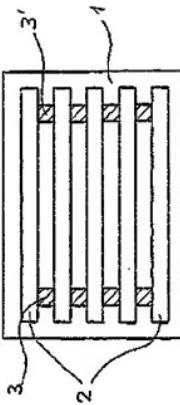


Fig. 2 d)

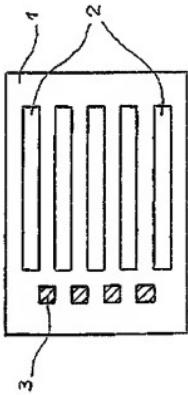


Fig. 2 a)

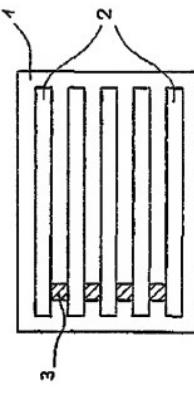


Fig. 2 c)

(53)

特許平11-505610

【図3】

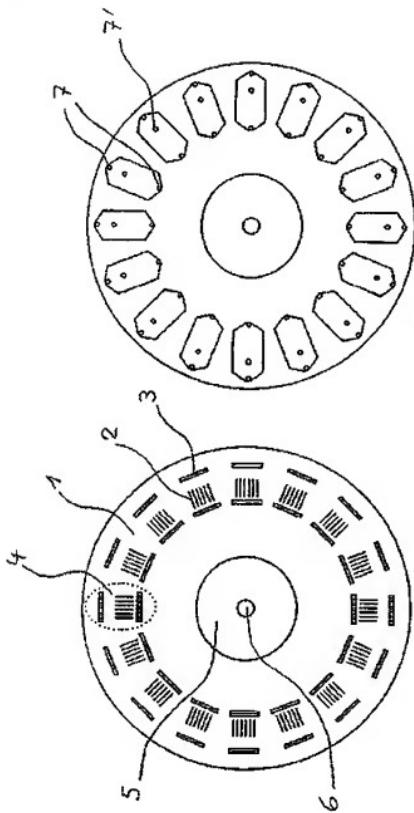


Fig. 3 b)

Fig. 3 a)

(54)

特許平11-505610

【図4】

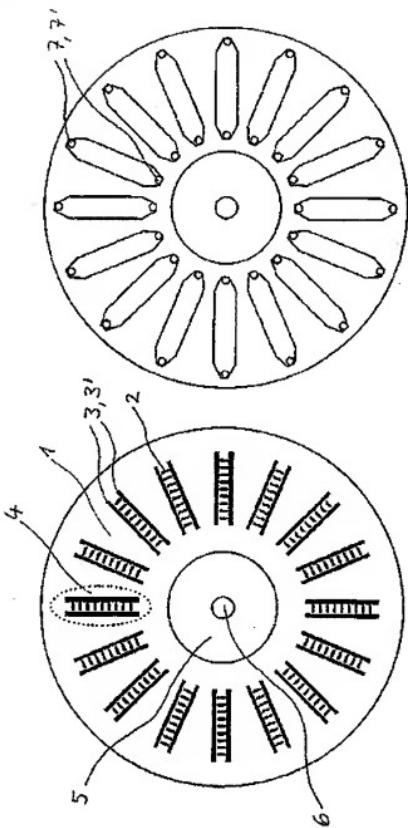


Fig. 4 b)

Fig. 4 a)

(55)

特表平11-505610

[図5]

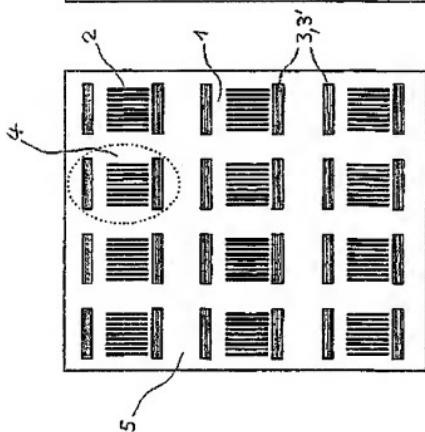
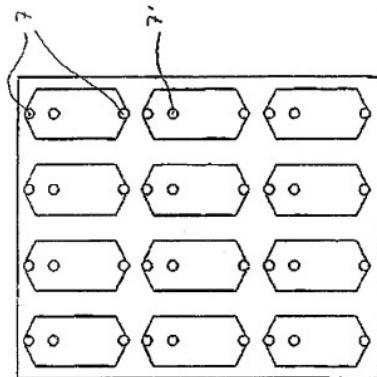


Fig. 5b)

Fig. 5a)

(56)

特表平11-505610

[図6]

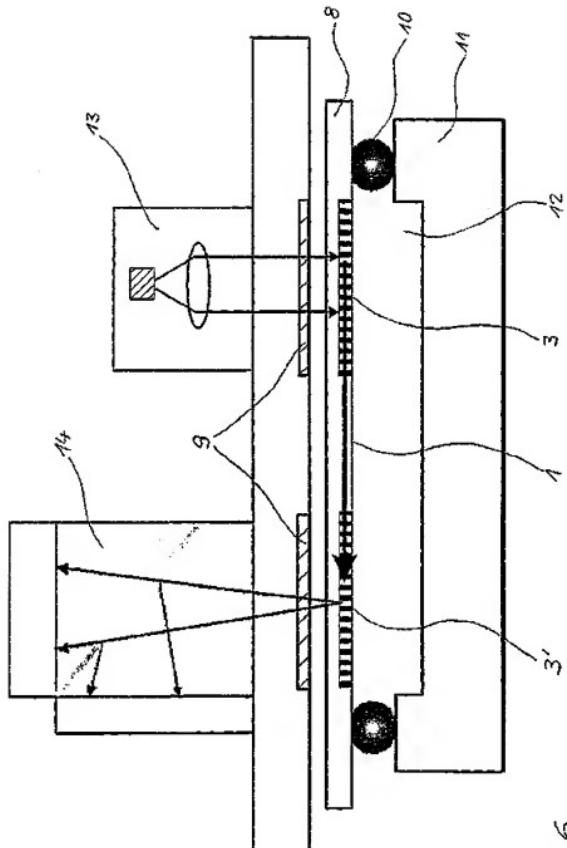


Fig. 6

(57)

特表平11-505610

[国际調査報告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Item No. Application No.
PCT/EP 96/01817

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N21/77		
According to International Patent Classification (IPC) or to its national classification, and IPC		
B. PRIOR ART SEARCHED Machinery documents searched (diametrical system: letters by classification symbols) IPC 6 G01N		
Documentation searched other than extension documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>US,A,5 081 012 (FLANAGAN) 14 January 1992 cited in the application</p> <p>see abstract see column 3, line 33 - line 59 see column 6, line 42 - line 52 see figure 8</p> <p>***</p> <p>-/-</p>	1-3, 6, 13, 19, 21, 22, 38, 45, 59
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family documents are listed in Annex

* Special categories of cited documents:	
<p>"A" document defining the present state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" document not published as or after the international filing date</p> <p>"C" document which may throw doubts on priority claim(s) or otherwise concern the examination of the application under aspects of patentability other than those mentioned in items (a) and (b)</p> <p>"D" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or publication</p> <p>"E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	
Date of the latest completion of the unexamined search	Date of ending of the unexamined search report
29 August 1996	6.09.96
Name and mailing address of the EPO European Patent Office, P.O. 3013 Petersham 2 NL-2200 HV Rijswijk Tel. (+31 70) 33 66 00 Fax. (+31 70) 33 66 30 0	Authorized office Thomas, R.H.

Form PCT/ISA/22 (first sheet) (Rev. 8/92)

(58)

特許平11-505610

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No.
PCT/EP 96/01817

C(ontaining) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.
Y	WO,A,92 14177 (FIBERCHEN) 20 August 1992 see abstract see page 2, line 32 - page 3, line 8 see page 9, line 24 - page 18, line 23 see page 13, line 6 - line 12 see page 14, line 9 - line 15 see figures 3B,6B,8C ---	1-3,6, 13,19, 21,22, 38,45,50
A	WO,A,91 10122 (BATELLE) 11 July 1991 cited in the application see abstract see page 11, line 25 - page 12, line 10 see page 17, line 25 - line 31 see page 18, line 11 - line 35 see page 28, line 32 - page 29, line 10 see figures 1,5 ---	1-3,13, 19,28, 23-26, 28-30
A	US,A,5 163 118 (LORENZO) 10 November 1992 see column 6, line 37 - column 7, line 26 see column 7, line 34 - line 37 see figures 5A,5C ---	1-3,5, 13,25,32
A	WO,A,95 03538 (BALZERS) 2 February 1995 cited in the application see page 2, line 19 - page 3, line 2 see page 3, line 11 - line 29 see page 11, line 8 - line 24 see figure 7 ---	1,2,18, 22-26,38
A	Clinical Chemistry, vol. 30, no. 9, 1984, pages 1533-1538, XP002811984 R.H. SUTHERLAND ET AL: "Optical detection of antibody-antigen reactions" see abstract; figure 2 ---	45-50, 58,59
P,A	OPTICAL ENGINEERING, vol. 34, no. 8, August 1995, BELLINGHAM US, pages 2396-2406, XP000518235 H.T. GALE ET AL: "Polymer & III-V transducer platforms for integrated optical sensors" -----	

Form PCT/ISA/01 (continuation of revised form) (1999-09-01)

(59)

特表平11-505610

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on prior art entries

Item: # Application No
PCT/EP 96/01817

Patent documents cited in search report	Publication date	Patent, family member(s)	Publication date
US-A-5081012	14-01-92	AT-T- 112626 AU-B- 612827 AU-B- 3360389 CA-A- 1314743 DE-D- 68918659 DE-T- 68918659 EP-A- 0363467 WO-A- 8909394 JP-B- 8607139 JP-T- 2504313 NO-B- 178708	15-10-94 18-07-91 15-10-92 23-03-93 19-11-94 09-02-95 18-04-93 05-10-89 29-01-95 05-12-93 05-02-95
WO-A-9214177	20-08-92	US-A- 5165605 AU-B- 1642592 CA-A- 2101072 EP-A- 0568452 JP-T- 6505556	17-11-92 07-09-92 25-07-92 10-11-93 23-06-94
WO-A-9110122	11-07-91	US-A- 5092629 CA-A- 2072588 EP-A- 0507883 JP-T- 6502612	21-01-92 30-06-91 14-10-92 03-03-94
US-A-5163118	16-11-92	US-A- 5354709	11-10-94
WO-A-9503538	02-02-95	EP-A- 0608924 JP-T- 8504955	05-07-95 28-05-96

Form PCT/ISA/01 (print or type unless otherwise indicated)

フロントページの焼き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L
 U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF
 , CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE,
 SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, S
 Z, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD
 , RU, TJ, TM), AL, AU, BB, BG, BR
 , CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IS, JP,
 KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, M
 N, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK
 , TR, TT, UA, US, UZ, VN

(72)発明者 バグラク, ミヒャエル

トイツ連邦共和国デー-79725ラオフエン
 ブルク、アンデルスバッハシュトラーセ5
 露

(72)発明者 ピーレス, ウーグュ

トイツ連邦共和国デー-79418シュリーン
 グン、イム・シュピツツガルテン13番

(72)発明者 プダッハ, ヴォルフガング

スイス、ツェーハー-1723マーリー、ルー
 ト・ドゥ・ベルエール26番

JP 1999-505610 A5 2004.7.8

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 6 部門第 1 区分

【発行日】平成 16 年 7 月 8 日 (2004.7.8)

【公表番号】特表平 11-505610

【公表日】平成 11 年 5 月 21 日 (1999.5.21)

【出願番号】特願平 8-533714

【国際特許分類第 7 版】

G 01 N 21/64

G 01 N 21/27

G 01 N 21/76

【F I】

G 01 N 21/64 Z

G 01 N 21/27 C

G 01 N 21/76

【手続補正書】

【提出日】平成 15 年 4 月 30 日 (2003.4.30)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

(2)

JP 1999-505610 A5 2004.7.8

手続補正書

平成15年 4月30日



特許庁長官兼

1. 事件の表示

平成08年特許第533714号

2. 補正をする者

氏名（名前） ノバルティス・アクテエンゲゼルシャフト

3. 代理人

住所

〒640-0001
 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル
 青山特許事務所
 電話 (06) 6949-1261 FAX (06) 6949-0361

氏名

弁理士 (6214) 青山 茂

4. 補正対象書類名 植求の範囲

5. 補正対象項目名 植求の範囲

6. 補正の内容 別紙の通り



請求の範囲

1. 連続した基板と、透過性で平面状で無機質の誘電体導波層とを包含するセンサプラットホームであって、
 - a) 前記透過性で無機質の誘電体導波層が少なくとも測定領域において少なくとも 2 つの導波領域に分割されており、波が導波される領域の有効屈折率が使用時に周囲の領域よりも大きいか、または前記導波層の分割が入射光を吸収するその表面上の物質により行なわれるという事実により分割されており；
 - b) 使用時に波動ベクトルの伝搬方向が入射後に維持されるように、前記導波領域がそれぞれ 1 個の入射グレーティングまたは共通の入射グレーティングを備えており；
 - c) 適切な場合、前記導波領域がそれぞれ 1 個の出射グレーティングまたは共通の出射グレーティングを備えていることを特徴とするセンサプラットホーム。
2. 前記基板上の前記個々の導波領域が多重検出領域を形成するように配置されていることを特徴とする請求項 1 に記載のセンサプラットホーム。
3. 中央切欠き部（6）を中心として自由に回転可能なディスクの形状を有し、前記ディスクを励起および検出用光学装置の下方で前記切欠き部を中心として回転させると複数の多重検出を連続して実施することができるよう、前記センサプラットホーム上に複数の多重検出領域（4）が接線方向または放射状に配列されていることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のセンサプラットホーム。
4. 使用時に、a) 前記センサプラットホーム上における透過性で平面状、無機質の誘電体導波領域が、屈折率の少なくとも 0.6 の増減により測定部に沿って相互に区分されており、b) 各領域が 1 個または 2 個の独立したグレーティングカブラを備えているか、またはすべての領域全体で 1 個または 2 個の共通のグレーティングカブラを備えており、c) 前記透過性で平面状、無機質の誘電体導波領域における厚さが 40ないし 160 nm、前記グレーティングの変調深度が 3ないし 6

0 nm、厚さに対する変調深度の比が0.5以下であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載のセンサプラットホーム。

5. 適切に構成されたマスクの下で、真空状態において、無機質の導波材料を蒸着することを包含する請求項1に記載のセンサプラットホームの作製方法。

6. 適切に構成された方式により、コロイド溶液から前記表面上に粒子の大きさが少なくとも10 nmの値を付着させることを包含する請求項1に記載のセンサプラットホームの作製方法。

7. 請求項1～6のいずれかに記載の導波領域の表面上に、1以上の同一または異なる分析対象物質に関する化学的または生化学的認識要素として1以上の特異的結合パートナーが固定化されていることを特徴とする変形されたセンサプラットホーム。

8. 多重流路貫流セルを通じて、溶解させた前記特異的結合パートナーを前記独立した導波領域にわたって通過させることを包含する請求項7に記載の変形されたセンサプラットホームを作製する方法であって、前記多重流路セルの流路が液体工学的または物理的に分離されていることを特徴とする方法。

9. 溶解させた前記特異的結合パートナーを前記独立した導波領域にスタンプによって付着させることを包含する請求項7に記載の変形されたセンサプラットホームを作製する方法。

10. 抗体または抗原、レセプターまたはリガンド、キレート化剤またはヒスチジン標識成分、オリゴヌクレオチド、DNA鎖またはRNA鎖、DNAまたはRNAのアナログ、酵素、酵素基質、酵素補因子または酵素阻害剤、レクチンおよび炭水化物の定量のための、請求項1または請求項9のいずれかに記載のセンサプラットホームまたは変形されたセンサプラットホームの後用。